

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO
CURSO DE MESTRADO**

THATYANE MARIANO RODRIGUES DE ALBUQUERQUE

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO E TECNOLÓGICO DE
CEPAS DE *Lactobacillus* ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO
DE FRUTAS**

JOÃO PESSOA – PB

2017

THATYANE MARIANO RODRIGUES DE ALBUQUERQUE

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO E TECNOLÓGICO DE
CEPAS DE *Lactobacillus* ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO
DE FRUTAS**

JOÃO PESSOA – PB

2017

THATYANE MARIANO RODRIGUES DE ALBUQUERQUE

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO E TECNOLÓGICO DE
CEPAS DE *Lactobacillus* ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO
DE FRUTAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Linha de Pesquisa: Análise e Controle de Qualidade de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA – PB

2017

A345c Albuquerque, Thatyane Mariano Rodrigues de.
Caracterização do potencial probiótico e tecnológico de
cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do
processamento de frutas / Thatyane Mariano Rodrigues de
Albuquerque. - João Pessoa, 2017.
92 f.: il. -

Orientador: Evandro Leite de Souza.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/ CCS

1. Nutrição. 2. Frutas - processamento. 3. *Lactobacillus*.
4. Propriedades probióticas. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 612.39(043)

THATYANE MARIANO RODRIGUES DE ALBUQUERQUE

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS DE *Lactobacillus*
ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE FRUTAS**

APROVADA EM: 05 / 05 / 2017

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
Orientador (DN/CCS/UFPB)



Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves
Examinador Interno (DN/CCS/UFPB)

Prof^a. Dr^a. Ingrid Conceição Dantas Guerra
Examinadora Externa (DG/CTDR/UFPB)

Prof^a. Dr^a. Marciane Magnani
Examinadora Suplente Interna (DEA/CCT/UFPB)

Prof^a. Dr^a. Celidarque da Silva Dias
Examinadora Suplente Externa (DCF/CCS/UFPB)

A minha mãe, que amo incondicionalmente, e devo acima de qualquer pessoa, a oportunidade de concretizar esse sonho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que está comigo em todos os momentos, que me ajuda a sobrepujar as dificuldades e me concede tantas bênçãos para realizar cada sonho almejado.

Aos meus avós maternos tão queridos, Heleno Mariano e Maria Mariano (*in memoriam*) por tudo que fizeram por mim e a minha mãe Alba Mariano pelo exemplo de mãe batalhadora, por todo cuidado demonstrado e por sempre ter incentivado os meus estudos.

Ao meu esposo, Marcelo Albuquerque, não tenho palavras para expressar toda minha gratidão, por estar sempre ao meu lado, me fazendo acreditar que posso mais do que imagino.

A minha irmã e cunhado, Thayris Mariano e Alan Medeiros, por serem um exemplo de inteligência e coragem, e as minhas irmãs mais novas, Thays e Thayza Souza, por terem sempre orgulho de mim e me ajudarem a ser uma pessoa melhor!

As minhas tias, primas e amigas (os) que sempre acreditaram em mim, que contribuíram e participaram de muitos momentos em minha vida, obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição (PPGCN) pela assistência, bem como ao meu orientador, Prof. Dr. Evandro Leite de Souza, pela oportunidade concedida, pelo exemplo de comprometimento, pelos ensinamentos e responsabilidades dadas que me fizeram querer ser cada vez melhor em tudo que me propus a realizar.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos que colaboraram para minha formação, em especial a Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia da Conceição, por ter me ensinado os primeiros passos da microbiologia, assim como a Prof^ª. Dr^ª. Estefânia Garcia pela contribuição no trabalho durante todo esse período.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida durante todo o período do mestrado, o que possibilitou que eu me dedicasse exclusivamente ao desenvolvimento da pesquisa e à elaboração dessa dissertação.

RESUMO

Vários benefícios para a saúde humana têm sido relacionados ao uso de microrganismos probióticos, os quais são representados majoritariamente por bactérias lácticas, com destaque para espécies do gênero *Lactobacillus*. Subprodutos do processamento de frutas têm sido reconhecidos como potenciais fontes de *Lactobacillus*, porém há uma escassez de estudos que avaliem o potencial de cepas de *Lactobacillus* isoladas destes materiais para uso como probióticos. Nesse contexto, este estudo avaliou nove cepas de *Lactobacillus* (*L. plantarum* 53, *L. fermentum* 56, *L. fermentum* 60, *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 250, *L. fermentum* 263, *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 141 e *L. fermentum* 296) isoladas de subprodutos do processamento de frutas em relação a uma série de propriedades de segurança (susceptibilidade a antibióticos, atividade hemolítica e degradação da mucina), funcionalidades fisiológicas (tolerância a pH ácido e sais biliares, desconjugação de sais biliares, hidrofobicidade da superfície celular, autoagregação, coagregação com patógenos, atividade antagonista frente a patógenos e capacidade de sobreviver durante a exposição a condições gastrointestinais simuladas) e tecnológicas (atividade proteolítica e lipolítica, tolerância a NaCl, produção de exopolissacarídeo e diacetil), as quais podem revelar o potencial uso destas cepas como probióticos. Considerando os aspectos de segurança, a resistência fenotípica para antibióticos variou entre as cepas de *Lactobacillus* testadas, e nenhuma das cepas apresentou atividade hemolítica e mucinolítica. Em relação às propriedades de funcionalidade fisiológica, nenhuma das cepas foi capaz de desconjugar sais biliares; todas elas apresentaram hidrofobicidade celular variado de baixa à moderada, foram capazes de autoagregar, coagregar com *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e exercer atividade antagônica frente bactérias patogênicas. A exposição a pH 2 causou diminuição acentuada nas taxas de sobrevivência das cepas examinadas após 1 ou 2 h de exposição; por sua vez, reduções variadas foram observadas após 3 horas de exposição a pH 3. De forma geral, a exposição a pH 5 e aos sais biliares (0.15, 0.3 e 1%) não diminuíram a sobrevivência das cepas testadas. As cepas examinadas apresentaram melhor capacidade para sobreviver à exposição às condições gastrointestinais simuladas em meio laboratorial e leite integral do que em suco de uva. Considerando as propriedades tecnológicas, todas as cepas testadas foram positivas para atividade proteolítica, produção de EPS e diacetil, e a maioria delas apresentou boa tolerância para 1 - 4% de NaCl. De forma geral, *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 e *L. fermentum* 296 demonstraram as melhores performances para a maioria das propriedades avaliadas. Estes resultados indicam que cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas podem ser candidatas para utilização como novas cepas probióticas.

Palavras-chave: fruta, subprodutos agroindustriais, *Lactobacillus*, propriedades probióticas, segurança, propriedades tecnológicas.

ABSTRACT

A variety of human health benefits have been related with the use of probiotic microorganisms, which are represented mainly by lactic bacteria but primarily by species belonging to the *Lactobacillus* genus. Fruit processing byproducts has been known as potential sources of *Lactobacillus*; however, studies on the probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from these materials are still scarce. In this context, this study examined nine *Lactobacillus* strains (*L. plantarum* 53, *L. fermentum* 56, *L. fermentum* 60, *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 250, *L. fermentum* 263, *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 141 and *L. fermentum* 296) isolated from fruit processing for a series of safety (e.g., antibiotic susceptibility, haemolytic activity and mucin degradation), physiological functionalities (e.g., acid and bile salts tolerance, bile salts desconjugation, cell surface hydrophobicity, autoaggregation, coaggregation with pathogens, antagonistic activity against pathogens and capability of surviving during exposure to simulated gastrointestinal conditions), and technological properties (e.g., proteolytic and lipolytic activity, tolerance to NaCl, exopolysaccharide and diacetyl production), that could enable their use as probiotics. Considering the safety aspects, the resistance to antibiotics varied among the examined strains, and none of the strains presented hemolytic and mucinolytic activity. Regarding the physiological functionality properties, none of the strains was able to deconjugate bile salts; all of them presented low to moderate cell hydrophobicity, were able to autoaggregate, coaggregate with *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* and antagonize pathogenic bacteria. The exposure to pH 2 sharply decreased the survival of the examined strains after 1 or 2 h-exposure; variable decreases were noted after 3 h-exposure to pH 3. Overall, the exposure to pH 5 and to bile salts (0.15, 0.3 and 1%) did not decrease the survival of the examined strains. The examined strains presented better ability to survive the exposure to simulated gastrointestinal conditions in laboratorial media and milk than in grape juice. Considering the technological properties, all the strains were positive for proteolytic activity, EPS and diacetyl production, and most of them had good tolerance to 1 - 4% NaCl. Overall, *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 and *L. fermentum* 296 showed the best performance for most of the evaluated properties. These results indicate that wild *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts could be candidates for use as new probiotics.

Keywords: fruit, agroindustrial byproducts, *Lactobacillus*, probiotic properties, safety, technological properties.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

METODOLOGIA

Quadro 1. Identificação das cepas de *Lactobacillus* utilizadas nos experimentos. 24

Tabela 1. Condições de exposição usadas durante cada fase da digestão simulada. 30

ARTIGO

Table 1. Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) of different antibiotics against *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts. 76

Table 2. Counts ($n = 9$, average values \pm standard deviation; log cfu/mL) of different *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts when challenged with different pH values and bile salt concentrations (w/v) for different exposure time periods. 77

Table 3. Physiological functionality and technological properties of different *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts. Results are expressed as average ($n = 9$) \pm standard deviation, with the exception of diacetyl production. 78

Table 4. Antagonistic activities of different *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts against food-related bacteria as measured by spot agar and well diffusion assays. Results are expressed in diameter (mm) of growth inhibition zones ($n = 9$; average \pm standard deviation). 79

Table 5. Percent survival rates ($n: 9$; average \pm standard deviation) of different *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts after 24 h-exposure to different NaCl concentrations. 80

S1. Counts ($n = 9$; average values \pm standard deviation; log cfu/mL) of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts when exposed to different phases of the simulated gastrointestinal digestion in grape juice, milk and de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) broth. 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| CFU | Colony-Forming Unit |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| EPS | Exopolissacarídeo |
| FAO | Food and Drug Administration |
| GRAS | Generally Recognized as Safe |
| LAB | Lactic Acid Bacteria |
| MIC | Minimum Inhibitory Concentration |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCA | Plate Count Agar |
| QPS | Qualified Presumedly as Segure |
| STF | Solução Tampão Fosfato |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| UHT | Ultra-High Temperature |
| WHO | World Health Organization |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 13 |
| 2.1 BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS E SEUS BENEFÍCIOS FUNCIONAIS..... | 13 |
| 2.2 PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS..... | 16 |
| 2.3 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS..... | 20 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 3.1 SELEÇÃO DAS CEPAS..... | 24 |
| 3.2 PROPRIEDADES DE SEGURANÇA..... | 24 |
| 3.2.1 Susceptibilidade a antibióticos | 24 |
| 3.2.2 Atividade hemolítica | 25 |
| 3.2.3 Degradação da mucina | 25 |
| 3.3 PROPRIEDADES DE FUNCIONALIDADES FISIOLÓGICAS..... | 26 |
| 3.3.1 Tolerância a diferentes valores de pH | 26 |
| 3.3.2 Tolerância a diferentes concentrações de sais biliares | 26 |
| 3.3.3 Desconjugação de sais biliares | 27 |
| 3.3.4 Hidrofobicidade da superfície celular | 27 |
| 3.3.5 Autoagregação e coagregação com <i>L. monocytogenes</i> e <i>E. coli</i> | 27 |
| 3.3.6 Atividade antagonista frente a bactérias patogênicas | 28 |
| 3.3.7 Exposição a condições gastrointestinais simuladas | 29 |
| 3.4 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS..... | 31 |
| 3.4.1 Atividade proteolítica | 31 |
| 3.4.2 Atividade lipolítica | 31 |
| 3.4.3 Tolerância a NaCl | 31 |
| 3.4.4 Produção de exopolissacarídeos | 31 |
| 3.4.5 Produção de diacetil | 32 |
| 3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 32 |
| REFERÊNCIAS | 33 |
| APÊNDICES | 50 |

1 INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais são definidos como todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica (BRASIL, 2016). A classificação de um alimento funcional pode ser dada de acordo com o alimento em si ou conforme a presença de componentes bioativos (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Os componentes bioativos oficialmente reconhecidos são ácidos graxos ômega 3, carotenóides, fibras alimentares, polióis, proteína de soja e probióticos (BRASIL, 2016).

A Organização Mundial de Saúde define probióticos como sendo microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2006). A modulação da composição e atividade do ecossistema microbiano responsável por sua colonização tem atraído grande interesse para o desenvolvimento de alimentos funcionais, o que pode ser confirmado pelo crescente mercado de alimentos incorporados com probióticos ou consumo de prebióticos na forma de suplementos (GRANATO et al., 2010; LANDMAN; QUÉVRAIN, 2016).

As bactérias lácticas, em sua maioria, apresentam potencial probiótico, o que torna sua utilização um atrativo, já que passam a auxiliar na manutenção da saúde dos indivíduos (GARCIA et al., 2016). Dentre as bactérias lácticas, o gênero *Lactobacillus* se destaca entre os probióticos mais utilizados, sendo formado por mais de 200 espécies e subespécies reconhecidas, as quais são comensais no trato gastrointestinal humano e comumente utilizadas para a fermentação de alimentos (CHIANG; PAN, 2012; ARGYRI et al., 2013; SUN et al., 2015). Para isso, normalmente se caracterizam como não patogênicas, adequadas tecnologicamente para processos industriais, tolerantes a pH ácido e sais biliares, além de exercer efeitos antagonistas frente a patógenos (MOJGANI; HUSSAINI; VASEJI, 2015).

Os mecanismos pelos quais os probióticos exercem seus efeitos podem envolver a modificação do pH por meio da produção de ácidos orgânicos, atividade antagonista sobre patógenos por meio da produção de compostos antimicrobianos, competição com patógenos por receptores de ligação, efeito de barreira no intestino, produção de enzimas (β -galactosidase, sal biliar hidrolase), síntese e aumento da disponibilidade de nutrientes (hidrólise de proteínas e lipídios), estimulação de células imunomoduladoras e redução da atividade de enzimas que ativam a carcinogênese (VASILJEVIC; SHAH, 2008; VENTURA et al., 2009; GHEYTANCHI et al., 2010; SAXAMI et al., 2016).

O isolamento e caracterização de novas cepas probióticas de substratos ainda pouco investigados podem ser vantajosos para obtenção de cepas com particularidades funcionais diferenciadas (TULUMOGLU; KAYA; SIMSEK, 2014; ILHA et al., 2015; SALVUCCI; LEBLANC; PÉREZ, 2016; LEE et al., 2016; DOMINGOS-LOPES et al., 2017). Embora já exista uma grande variedade de produtos lácteos contendo probióticos, o mercado ainda busca por inovações e novas formulações de produtos não lácteos capazes de garantir a eficácia das bactérias durante a vida útil do produto (ARGYRI et al., 2015; GEISSLER et al., 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016).

Subprodutos do processamento de frutas apresentam uma grande variedade de microrganismos de interesse para a indústria de alimentos, incluindo bactérias lácticas (YANG et al., 2010). Os produtos derivados de frutas aparecem como matrizes alimentares alternativas para formulação de alimentos probióticos, tendo em vista a variedade de compostos bioativos presentes nas frutas e sua boa aceitação pelos consumidores (COSTA et al., 2013a; BEDANI et al., 2014; RUSSO et al., 2015). A adaptação natural às características intrínsecas da fruta pode auxiliar bactérias lácticas obtidas destes substratos a sobreviver durante o processamento e armazenamento de formulações probióticas, bem como ao longo da exposição às condições estressantes impostas durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano (GARCIA et al., 2016).

Considerando tais aspectos, o objetivo desse trabalho foi avaliar algumas propriedades de segurança, funcionalidade fisiológica e tecnológicas de cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas, as quais em conjunto podem revelar o seu potencial uso como probióticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BACTÉRIAS LÁTICAS PROBIÓTICAS E SEUS BENEFÍCIOS FUNCIONAIS

O termo “alimentos funcionais” foi primeiramente introduzido no Japão por serem alimentos reconhecidos pela ciência por seus efeitos benéficos na saúde (BALDISSERA et al., 2011). O princípio, então, foi rapidamente adotado mundialmente (HASLER, 2002). Entretanto, as denominações das alegações, bem como os critérios para sua aprovação variam de acordo com a regulamentação de cada país ou de blocos econômicos (STRINGHETA et al., 2007; BRASIL, 2016).

Assim, o conceito de alimentos funcionais proposto inicialmente refere-se aos alimentos utilizados como parte de uma dieta normal que demonstram benefícios fisiológicos além das suas funções básicas nutricionais (COSTA; ROSA, 2010; CHONAN, 2011). Nesse contexto, os benefícios proporcionados pelos alimentos funcionais sobre a saúde humana são conhecidos há muito tempo, mas o interesse no estudo desses alimentos, de seus compostos bioativos e do impacto do consumo na saúde tornou-se intenso apenas nas últimas décadas (MARTINS et al., 2013).

As bactérias láticas são consideradas o principal grupo de microrganismos probióticos em função da sua longa história de uso, de ser parte natural da microflora do ambiente intestinal e, principalmente, por não estarem associadas a efeitos patogênicos, sendo, assim, geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) ou presumidamente qualificadas como seguras (QPS) (ZHANG et al., 2013). Essas bactérias estão amplamente distribuídas na natureza e constituem um grupo composto por 13 gêneros, a citar: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactoshaepa*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (PATRICK, 2012). Embora os limites taxonômicos desse grupo venham sendo objeto de algumas controvérsias, historicamente, os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* formam o núcleo do grupo, sendo poucos os gêneros ainda que possuem efeito probiótico bem documentado (MAYO et al., 2010; ANGMO et al., 2016).

Sobre sua morfologia, as bactérias láticas apresentam a forma de cocos, coco-bacilos ou bastonetes, sendo caracterizadas como Gram-positivas, ácido tolerantes, não esporuladas, nutricionalmente fastidiosas, anaeróbias e aeróbias facultativas, mesófilas ou termófilas, com temperaturas ótimas de crescimento de 30 a 37 °C e 45 a 50 °C, respectivamente, incapazes de sintetizar porfirinas, catalase e motilidade negativas (STEFANOVIC; FITZGERALD;

MCAULIFFE, 2017). Estão funcionalmente relacionadas devido a sua capacidade comum de produzir primariamente ácido lático a partir de hexoses (MAKAROVA; KOONIN, 2007).

Quanto ao seu metabolismo, essas bactérias podem ser classificadas como homofermentativas, pela produção de ácido lático como o principal ou único produto, a exemplo de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*; ou heterofermentativas, produtoras de quantidades similares de ácido lático, dióxido de carbono e etanol, além da produção de compostos de *flavor* e aroma, como acetaldeído e diacetileno, a exemplo de *Leuconostoc*, *Weissela* e alguns *Lactobacillus* (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Atualmente, diferentes investigações apoiam a importância de probióticos como parte de uma dieta saudável (OH; JUNG, 2015; ANGMO et al., 2016). Estudos mostram que a ingestão de alimentos suplementados com bactérias probióticas tem sido associada a uma variedade de benefícios para a saúde humana, tais como: efeito antidiabético (PANWAR et al., 2016), anti-hipertensivo (LOLLO et al., 2015; AHRÉN et al., 2015; MIREMADI; SHERKAT; STOJANOVSKA, 2016), antiobesidade (ARORA; SINGH; SHARMA, 2013; KANG et al., 2013; JUNG et al., 2015), antioxidante (SPYROPOULOS et al., 2011; DAS; GOYAL, 2015; CAMPANELLA et al., 2017), antimutagênico e anticarcinogênico (COOK et al., 2012; CHIANG; PAN, 2012; UCCELLO et al., 2012; ZHONG; ZHANG; COVASA, 2014; SAXAMI et al., 2016), antialérgico (SOCCOL et al., 2010; HUANG et al., 2016), antidepressivo (GAYATHRI; RASHMI, 2017) e imunomodulador (IBRAHIM et al., 2010; PAGNINI et al., 2010; LOLLO et al., 2012; CHIANG; PAN, 2012).

Além disso, auxiliam na melhoria da intolerância à lactose e diminuição dos níveis de colesterol (OOI; LIONG, 2010; KUMAR et al., 2012; MIREMADI et al., 2014; CHOI; CHANG, 2015; SHEHATA et al., 2016), na prevenção e alívio dos sintomas de diarreia (SOCCOL et al., 2010; SHEELA; SUGANYA, 2012; CHINGWARU; VIDMAR, 2017), na saúde oral e intestinal de idosos (LAHTINEN et al., 2012), na prevenção de doenças cardiovasculares (CHIANG; PAN, 2012; SAAD et al., 2013), no tratamento de distúrbios digestivos graves (SOCCOL et al., 2010; DESHPANDE et al., 2010; DEL CARMEN et al., 2011), na prevenção da osteoporose (BRITTON et al., 2014, OHLSSON et al., 2014), na atenuação dos sintomas de doenças relacionadas ao estresse, tais como ansiedade e depressão (BRAVO et al., 2011), e no desempenho cerebral (HEIJTZ et al., 2011; SELHUB; LOGAN; BESTED, 2014; BORRE et al., 2014; MU; YANG; ZHU, 2016).

Os benefícios atribuídos aos microrganismos probióticos tem sido alcançados, principalmente, por meio da modulação da população e atividade da microbiota intestinal, as

quais exercem grande influência em reações bioquímicas no hospedeiro (TAMBEKAR; BHUTADA, 2010; NICCOLI et al., 2014; KRISTENSEN et al., 2016). Além disso, quando a microbiota intestinal se encontra em equilíbrio, impede que microrganismos potencialmente patogênicos exerçam seus efeitos, mas por outro lado, estando em desequilíbrio, pode resultar no estímulo à proliferação desses patógenos (DRAGO et al., 2012; QUIGLEY, 2017).

Também é importante ressaltar que os efeitos sobre a promoção da saúde são linhagem-dependente e que não existe uma única cepa probiótica capaz de fornecer todos os benefícios mencionados acima (SHAH, 2007; AURELI et al., 2011). Sabe-se, ainda, que alguns microrganismos ou extratos de microrganismos inativados antes do consumo também podem ser benéficos para a saúde, mas atualmente estes materiais são desqualificados para o grupo de probióticos (FAO/WHO, 2006; TULUMOGLU et al., 2014; BRASIL, 2016).

Além disso, para garantir um efeito consistente, os probióticos devem ser utilizados em condições adequadas, incluindo dose e tempo de utilização, mas esses dados ainda não estão bem definidos (SAAD et al., 2013). No Brasil, a legislação atual estabelece que a quantidade mínima viável de cultura probiótica deve ser entre 10^8 e 10^9 UFC por g ou mL e que a população deve ser indicada no rótulo do produto (BRASIL, 2016). Alguns autores sugerem ainda que a dose mínima para assegurar o efeito terapêutico está entre 10^6 e 10^9 UFC por porção diária (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Populações de 10^6 a 10^7 UFC por g ou mL também foram estabelecidas como capazes de exercer efeitos benéficos à saúde (LAHTINEN et al., 2010; KORBKANDI; MORTAZAVIAN; IRAVANI, 2011; GEBARA et al., 2015).

As informações disponíveis sobre a concentração de microrganismos probióticos necessários para efeitos biológicos leva a conclusão de que ela poderá variar em função do efeito de saúde desejado (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005). Também foi afirmado que os produtos probióticos devem ser consumidos continuamente para obter um impacto significativo na saúde com uma quantidade aproximada de 100 g/dia do alimento carreador, com a finalidade de se alcançar a população de 10^9 UFC/mL de células viáveis no intestino (KARIMI; MORTAZAVIAN; CRUZ, 2011; SANDERS, 2011).

Devido a essas questões, a legislação brasileira permite valores abaixo da população mínima requerida de probióticos, desde que se comprove a eficácia do microrganismo no produto e na concentração inferior (BRASIL, 2016). Autores relatam que a eficácia dos probióticos é influenciada pela sua viabilidade no produto de origem, pelo armazenamento desse produto sob temperaturas adequadas de refrigeração e pela ação dos fluidos biológicos associados à digestão (CHAN; ZHANG 2005; CRUZ et al., 2009a; KARIMI; MORTAZAVIAN; CRUZ, 2011).

Desse modo, tem crescido o interesse na pesquisa e seleção de linhagens de bactérias lácticas como probióticas que possam ser utilizadas para manter a homeostase do trato gastrointestinal, prevenir e combater infecções bacterianas e como alternativa a formulações farmacêuticas (COSTA; ROSA, 2010; DOMINGOS-LOPES et al., 2017).

2.2 PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

A seleção de cepas probióticas tem se baseado na segurança oferecida para o hospedeiro e na funcionalidade exercida após sua ingestão (SAARELA et al. 2000; FAO/WHO, 2006; TRIPATHI; GIRI, 2014; BRASIL, 2016). Essas culturas estão localizadas em diferentes regiões do trato gastrointestinal e modulam a microbiota nesses espaços, principalmente, devido aos seus produtos de metabolismo (MENEZES; DURRANT, 2008; FRITZEN-FREIRE et al., 2013; OZYURT; OTLES, 2014).

Embora um número razoável de cepas probióticas já esteja bem caracterizado, bactérias lácticas têm sido isoladas de uma diversidade de ambientes, lácteos e não lácteos, a fim de buscar novas linhagens com potencial probiótico (KUMAR; KUMAR, 2015; SHEHATA et al., 2016). Assim, nos últimos anos, foram estudados isolados de bactérias lácticas oriundos de leite (PERIN et al., 2014; ANANDHARAJ; SIVASANKARI, 2014; MARROKI; BOUSMAHA-MARROKI, 2014; SINGH et al., 2014; BAUR et al., 2015; ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015), queijos (COSTA et al., 2013b; SOLIERI et al., 2014; TULUMOGLU; KAYA; SIMSEK, 2014; LEITE et al., 2015; SANTOS et al., 2015; DOMINGOS-LOPES et al., 2017), cereais (OGUNTOYINBO; NARBAD, 2015; MANINI et al., 2016; SALVUCCI; LEBLANC; PÉREZ, 2016), vegetais (JI et al., 2013; ANANDHARAJ et al., 2015; CHOI; CHANG, 2015; LEE et al., 2016; KHAN; KANG, 2016; SADE; LASSILA; BJORKROTH, 2016), pão (DEMIRBAS et al., 2017), azeitonas (ARGYRI et al., 2013; BAUTISTA-GALLEGO et al., 2013), bebidas (GARCÍA-RUIZ et al., 2014; SAGDIC et al., 2014; ANGMO et al., 2016), especiarias (SADE; LASSILA; BJORKROTH, 2016), salsichas (LANDETA et al., 2013), trato gastrointestinal humano (TULUMOGLU et al., 2013; REN et al., 2014; PANICKER; BEHARE, 2014), amostras marinhas (DAS, KHOWALA, BISWAS, 2016) e superfícies (OUALI et al., 2014).

Alguns estudos também demonstram que diferentes cepas de bactérias lácticas têm sido isoladas de frutas (DI CAGNO et al, 2010; VITALI et al., 2012; NAEEM et al., 2012; DIAS et al., 2014; ILHA et al., 2015; GARCIA et al., 2016). As frutas e seus derivados são, em geral, alimentos ácidos. A elevada acidez é considerada o principal fator de influência para

selecionar a microflora predominante de frutas, pois restringe a microbiota deteriorante e, principalmente, os microrganismos patogênicos que, em sua maioria, são incapazes de sobreviver em tais condições (SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007; NAEEM et al., 2012).

A biodiversidade microbiana das frutas depende de fatores ambientais, como umidade, temperatura, população do solo, mas também das propriedades físico-químicas de cada espécie de fruta (THOMAS; SOLY, 2009). As frutas são consideradas carreadoras ditas ideais para culturas probióticas em virtude de apresentarem nutrientes benéficos para a saúde do hospedeiro, como vitaminas, minerais, fibras dietéticas e antioxidantes (DING; SHAH, 2008). Além disso, os açúcares e ácidos orgânicos presentes naturalmente nas frutas podem atuar como substrato para o desenvolvimento desses microrganismos (MOUSAVI et al., 2011).

Os sucos de frutas naturais contêm ingredientes eliminadores de oxigênio como ácido ascórbico, promovendo assim condições anaeróbicas essenciais para otimizar o crescimento de bactérias láticas (COSTA et al., 2013a) e não contêm culturas *starter* que concorram com os probióticos por nutrientes (DING; SHAH, 2008; SOHAIL et al., 2012).

Um ponto a ser considerado ainda, além da composição química dos alimentos, consiste na sua estrutura física, as quais são importantes na capacidade de manutenção da viabilidade do probiótico que estão a suportar (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). Frutas são compostos, principalmente, por celulose, que não é digerido pelo sistema gastrointestinal, e podem atuar como barreira protetora para muitas bactérias probióticas durante a digestão (ROBLE et al., 2010; ALEGRE et al., 2011). As características intrínsecas da superfície da planta, devido à presença de sucos e compostos prebióticos naturais (tais como oligossacarídeos), também protegem os microrganismos probióticos a partir do ambiente ácido do estômago e são uma fonte de nutrientes, o que influencia positivamente a sobrevivência bacteriana nessas condições (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Após o isolamento, alguns requisitos mínimos são necessários para que uma cepa seja considerada probiótica, como determinação dos padrões de resistência a uma variedade de antibióticos, avaliação de certas atividades metabólicas, avaliação de efeitos secundários durante estudos envolvendo seres humanos, vigilância epidemiológica de incidentes adversos em consumidores (pós-comercialização) e se a cepa avaliada pertence a uma espécie com potencial hemolítico conhecido (FAO/WHO, 2006; BRASIL, 2016). Apesar de algumas espécies de bactérias láticas já serem classificadas como GRAS, torna-se importante avaliar a segurança dos microrganismos destinados ao uso quando incorporados em alimentos (DAS; KHOWALA; BISWAS, 2016).

Devido, principalmente, ao uso extensivo nos últimos anos de antibióticos em humanos e animais, estudos mostram uma incidência generalizada de resistência a antibióticos adquirida por isolados de bactérias láticas (MONTEAGUDO-MERA et al., 2012; PESAVENTO et al., 2014, SHARMA et al. 2016). Esse fato é preocupante devido ao risco desses microrganismos transferirem os genes resistentes para outras bactérias, incluindo as patogênicas, que conseqüentemente não poderão ser eficientemente tratadas com os antibióticos que eram anteriormente eficazes (ADIMPONG et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Porém, a resistência intrínseca a certos antibióticos pode ser considerada desejável para esse grupo de bactérias, uma vez que poderão desempenhar um papel probiótico no trato gastrointestinal humano durante a terapia com antibióticos (SHARMA et al., 2016).

A atividade hemolítica também deve ser ausente em cepas de bactérias láticas, pois a hemólise consiste no rompimento da membrana plasmática da hemácia, resultando na diminuição da circulação dessas células, o que provocará uma redução da oxigenação dos tecidos (KAUSHANSKY et al, 2010). Dessa forma, com a destruição da hemácia, ocorre a liberação da hemoglobina no plasma, o que causa anemia e edema no hospedeiro, sendo a β -hemólise a forma mais preocupante por romper totalmente a hemácia, seguida da α -hemólise que causa perda parcial da hemoglobina (VESTERLUND et al., 2007; GIRAFFA, 2012).

Para que sejam consideradas seguras, ainda é importante avaliar as cepas potencialmente probióticas quanto a sua atividade de degradação da mucina. A produção de enzimas degradantes da mucina tem sido sugerida como um determinante de virulência para alguns enteropatógenos, e é considerada uma característica não desejável para os probióticos, uma vez que pode favorecer a alteração da barreira da mucosa intestinal (ZHOU et al., 2001; MONTEAGUDO-MERA et al., 2012).

Os aspectos de funcionalidade das cepas probióticas estão relacionados ao papel otimizador que irão desempenhar no trato gastrointestinal humano após sua ingestão (SAARELA et al., 2000; FAO/WHO, 2006). Este processo começa na boca, continua no estômago, intestino delgado, e é finalizado no cólon, tanto pelas substâncias absorvidas, quanto pela ação da microbiota desenvolvida nestes ambientes (GUERRA et al., 2012).

Embora não haja marcadores fenotípicos eficazes que possuam as características de funcionalidade dos probióticos, as cepas promissoras devem ser habitantes naturais do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago e manter a viabilidade e atividade no intestino (LEBEER; VANDERLEYDEN; KEERSMAECKER, 2010; COOK et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

A acidez gástrica é considerada o principal mecanismo de defesa contra microrganismos, pois estes precisam suportar o efeito de cerca de 2,5 L de suco gástrico secretados diariamente no trato digestivo humano (ARGYRI et al., 2013). Assim, a resistência à passagem gástrica é uma propriedade não comum entre as bactérias láticas, embora algumas cepas demonstrem tolerância a pH baixo (COTTER; HILL; ROSS, 2005; WU et al., 2012).

Os sais biliares secretados no intestino delgado também representam um desafio para a sobrevivência bacteriana (SHEHATA et al., 2016). Além de sobreviver, algumas cepas probióticas possuem a capacidade para desconjugar os sais biliares. Essa capacidade já foi considerada indesejável para os probióticos (SAARELA et al., 2000), mas atualmente tem mostrado contribuir para a redução dos níveis séricos de colesterol no hospedeiro (WANG et al., 2012; MIREMADI et al., 2014; CHOI; CHANG, 2015). De fato, algumas cepas de bactérias láticas segregam a enzima hidrolase de sal biliar, que hidrolisa os ácidos biliares conjugados para liberar ácidos biliares desconjugados e aminoácidos (FRANZ et al., 2011). Como os ácidos biliares resultantes são menos solúveis que a respectiva forma conjugada, a sua absorção intestinal é menor, aumentando a sua excreção nas fezes e a síntese de novos sais biliares, o que requer colesterol (OOI; LIONG, 2010).

A adesão ao trato gastrointestinal é determinante para a colonização e um tempo de permanência prolongado no hospedeiro, sendo considerado um dos principais critérios de seleção para potenciais probióticos (KAUSHIK et al., 2009). A natureza hidrofóbica da superfície celular está relacionada à capacidade do microrganismo de aderir às células epiteliais intestinais, embora não seja um pré-requisito para uma forte aderência, uma vez que o processo de adesão microbiana ao tecido do hospedeiro possivelmente envolve vários mecanismos (KHAN; KANG, 2016; ANGMO et al., 2016).

Estudos relatam que a hidrofobicidade e a capacidade de agregação podem estar correlacionadas às propriedades de aderência celular (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2008, JANKOVIC et al., 2012). A agregação entre células bacterianas também é considerada um fator importante na adesão e na formação do seu biofilme, pois facilita a colonização transitória contribuindo para a persistência de microrganismos benéficos na mucosa do sistema digestivo e, conseqüentemente, para estabelecer os efeitos sobre a saúde (SANTOS et al., 2015).

Além disso, a coagregação exercida por bactérias láticas, particularmente *Lactobacillus*, pode ser considerada uma característica positiva, uma vez que pode promover efeitos antagonistas contra patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* (TUO et al., 2013; ANGMO et

al., 2016). Esses efeitos antagonistas podem ser alcançados utilizando vários mecanismos que envolvem a produção de compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico), peróxido de hidrogênio e bacteriocinas; bem como, pela competição por sítios de ligação na mucosa intestinal (TAMBEKAR et al., 2009; DOBSON et al., 2012; SCHIRRU et al., 2012).

Desse modo, através das propriedades de adesão, formação de barreira por autoagregação ou pela ação direta contra patógenos por meio de coagregação, bactérias lácticas atuam na prevenção da colonização intestinal de patógenos, agindo assim de forma benéfica no hospedeiro (TODOROV et al., 2008; VIJAYAKUMAR et al., 2015).

2.3 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS

A triagem de novas cepas de bactérias lácticas com potencial probiótico é interessante para diversos setores, como a indústria de alimentos, farmacêutica e veterinária (AYENI et al., 2011; ILHA et al., 2015; SALVUCCI et al., 2016). Embora uma cepa bacteriana cumpra com os critérios de segurança e funcionalidade necessários, aspectos relacionados à produção e ao processamento de alimentos probióticos também são de grande importância (MAKINEN et al., 2012; DOMINGOS-LOPES et al., 2017). As características tecnológicas encontradas nas cepas potencialmente probióticas se baseiam na capacidade de sobreviverem durante a produção e armazenamento dos produtos e de oferecerem propriedades nutricionais, físico-químicas e sensoriais diferenciadas ao produto final (SALVUCCI; LEBLANC; PÉREZ, 2016; CORBO et al., 2017).

A aplicação de culturas probióticas em diferentes matrizes alimentares representa um grande desafio para a manutenção da viabilidade desses microrganismos, pois a matriz utilizada pode influenciar largamente as propriedades funcionais das cepas probióticas se estas não possuírem propriedades tecnológicas adequadas (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010; SHORI, 2016). Por isso, os probióticos utilizados na indústria devem ser apropriados para cada tipo de produto, gerando grande empenho tecnológico para minimizar a perda de viabilidade ocasionadas pelas lesões celulares induzidas pelo calor, mecânica ou osmótica, além da sensibilidade à exposição de oxigênio e pH ácido (FU; CHEN, 2011; BUSTOS; BÓRQUEZ, 2013).

Torna-se importante considerar também que diferentes espécies bacterianas apresentam padrões distintos de comportamento e atividades sob condições industriais (BURNS et al., 2012). Embora os produtos probióticos possam ser comercializados na forma de cápsulas,

sachês, pós, tabletes, suspensões líquidas e secas, há uma melhor adequação em ingerir probióticos quando incorporados em alimentos do que por meio do consumo de fórmulas farmacêuticas orais, devido a sua baixa ou falta de viabilidade demonstrada após a ingestão (WEICHSELBAUM, 2009; CAILLARD; LAPOINTE, 2017).

Atualmente, a busca por produtos que melhor se adequem como carreadores de probióticos tem sido dividida entre produtos lácteos e não lácteos (BAKR, 2015; SHORI, 2016). Assim, as matrizes lácteas que têm sido mais testadas e têm apresentado os melhores resultados como veículos de probióticos são os leites fermentados (HAMET; PIERMARIA; ABRAHAM, 2015; DIMITRELLOU et al., 2016; ORTIZ-RIVERA et al., 2017), iogurtes (ESPÍRITO-SANTO et al., 2010, RANADHEERA et al., 2012; ESPÍRITO-SANTO et al., 2012; BEZERRA et al., 2015), leite (DUARTE et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017), queijos (OLIVEIRA et al., 2014; GANESAN et al., 2014; BEZERRA et al., 2017), sorvetes (CRUZ et al., 2009b; RANADHEERA et al., 2012; LEANDRO et al., 2013; SILVA et al., 2015; CRUXEN et al., 2017) e sobremesas (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; BURITI; KOMATSU; SAAD, 2007).

Quanto às matrizes não lácteas estudadas como potenciais veículos para bactérias lácticas probióticas, pode-se citar: frutas (ROBLE et al., 2010; ALEGRE et al., 2011; NOORBAKHS; YAGHMAEE; DURANCE, 2013; RUSSO et al., 2015), sucos de frutas (SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007; CHAMPAGNE; GARDNER, 2008; MOUSAVI et al., 2010; NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011; ANEKELLA; ORSAT, 2013; PIMENTEL et al., 2015; NEMATOLLAHI et al., 2016), sucos de vegetais (YOON; WOODAMS; HANG 2006; KLEWICKA; ZDUNCZYK; JUSKIEWICZ, 2009; NICOLESCO; BURULEANU, 2010), chocolate (POSSEMIERS et al. 2010), cereais (CHEN; MUSTAPHA, 2012; BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2014; SALMERÓN, THOMAS, PANDIELLA, 2015; PEYER; ZANNINI; ARENDT, 2016), produtos cárneos (MUTHUKUMARASAMY; HOLLEY, 2007; KHAN et al., 2011; RUIZ-MOYANO et al., 2011; ARIHARA 2014), e pão (ALTAMIRANO-FORTOUL et al., 2012).

Com isso, várias características tecnológicas devem ser consideradas na seleção de probióticos que serão utilizados como aditivos alimentares, como atividade proteolítica e lipolítica, tolerância a determinadas concentrações de NaCl, produção de exopolissacarídeos (EPS) e diacetil, as quais irão influenciar diretamente nas propriedades sensoriais do produto, na viabilidade celular durante o processamento e na estabilidade durante o armazenamento (SAARELA et al., 2000; SALVUCCI; LEBLANC; PÉREZ, 2016).

A atividade proteolítica e lipolítica de bactérias lácticas é importante para determinar potenciais impactos nas propriedades dos alimentos que serão produzidos e na qualidade do produto final (PIRAINO et al., 2008; ZDOLEC et al., 2013). A proteólise desempenha um papel importante na geração de peptídeos e aminoácidos para o crescimento bacteriano e na formação de metabólitos que contribuem para a elaboração do sabor em produtos fermentados (BELGACEM et al., 2010). Por outro lado, o baixo nível de lipólise desses microrganismos é importante para a produção de alimentos, uma vez que uma concentração equilibrada de ácidos graxos livres e produtos de proteólise tem importante contributo para o desenvolvimento de *flavor* em alimentos (PAPANIKOLAOU et al., 2012).

Vários alimentos contêm sal (NaCl) como um potenciador do sabor ou como um agente de conservação, mas a sua presença em alimentos probióticos pode ocasionar estresse osmótico, o qual vem a comprometer a viabilidade celular das culturas, tornando-se muitas vezes o principal fator inibidor do crescimento bacteriano e da fermentação no produto (GE et al., 2011; GREGORET et al., 2013). Para tolerar NaCl, alguns mecanismos desenvolvidos por bactérias lácticas são descritos como, por exemplo, a captação ou síntese de número limitado de solutos (BREMER; KRAMER, 2000). Os fatores que influenciam essa propriedade devem ser considerados, entretanto a diversidade de comportamento entre as cepas ainda é pouco explorada (WU et al., 2012; REALE et al., 2015). Assim, torna-se desejável que os microrganismos probióticos possam suportar as concentrações de NaCl utilizadas na formulação dos alimentos em que estão inseridos (ILHA et al., 2015).

Dentre as diversas moléculas produzidas por microrganismos com aplicações biotecnológicas, os EPS são particularmente interessantes por apresentarem uma variedade de aplicações industriais (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013). Os EPS produzidos por bactérias lácticas contribuem para a textura, aparência e paladar, além de melhorarem a estabilidade e propriedades reológicas de vários produtos lácteos (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011). Ainda, tem sido relatado que EPS podem possuir propriedades benéficas à saúde, tais como atividade antitumoral e imunomoduladora, redução do colesterol e prevenção ao aparecimento de úlceras (GROSU-TUDOR et al., 2013; PATTEN et al., 2014; JOSHI; KOIJAM, 2014).

Devido as suas propriedades tecnológicas, diversas cepas probióticas se destacam por melhorarem atributos sensoriais no alimento, especialmente aroma e sabor (DOMINGOS-LOPES et al., 2017). Contudo, algumas cepas podem afetar negativamente as propriedades sensoriais dos produtos quando utilizadas sob condições consideradas inadequadas (ANTUNES et al., 2013). A fermentação pode contribuir para a qualidade sensorial,

segurança e funcionalidade dos produtos alimentícios, além de ser amplamente aceita como um meio tradicional de preservação de alimentos (BOURDICHON et al., 2011).

Produtos do metabolismo das bactérias lácticas também são tecnologicamente interessantes no desenvolvimento de propriedades sensoriais particulares, como a produção de diacetil, uma vez que este composto tem importante papel no desenvolvimento de *flavor* de variados produtos (MAYO et al., 2010; PATEL; PRAJAPATI, 2013). Estudos demonstram que isolados de bactérias lácticas, inclusive pertencentes ao mesmo gênero, apresentam variação na produção de diacetil, havendo microrganismos de uma mesma população que contribuem mais do que outros para a formação do *flavor* (FRANCIOSI et al., 2009).

Dessa forma, a sobrevivência de culturas probióticas em produtos alimentares depende das propriedades tecnológicas da cepa utilizada e dos parâmetros físico-químicos do produto (COSTA et al., 2017). As propriedades tecnológicas de bactérias lácticas têm contribuído na qualidade e estabilidade de produtos alimentares, sendo assim, relevantes para o padrão geral e aceitação do produto final e para aumentar o espectro de aplicações biotecnológicas destes microrganismos (SALVUCCI; LEBLANC; PÉREZ, 2016).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DAS CEPAS

Neste estudo foram utilizadas cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas, pertencentes ao banco de cepas do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba. Desse modo, foram selecionadas 09 cepas previamente identificadas (Quadro 1) através do sequenciamento de genes 16S rRNA e pelo perfil MALDI-TOF (GARCIA et al., 2016), as quais foram mantidas sob -20 °C em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS; HiMedia, Mumbai, Índia) contendo glicerol (20%, v/v). Antes do uso nos ensaios, cada cepa de *Lactobacillus* foi cultivada (1%, v/v) anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) em caldo MRS a 37 °C por 20 – 24 horas (fase estacionária de crescimento). Estas culturas atingiram contagens de células viáveis de 7 – 8 log UFC/mL quando inoculadas em ágar MRS.

Quadro 1. Identificação das cepas de *Lactobacillus* utilizadas nos experimentos.

| CEPA | FONTE |
|-------------------------|------------------------|
| <i>L. plantarum</i> 53 | Subproduto de acerola |
| <i>L. fermentum</i> 56 | Subproduto de acerola |
| <i>L. fermentum</i> 60 | Subproduto de acerola |
| <i>L. paracasei</i> 106 | Subproduto de graviola |
| <i>L. fermentum</i> 139 | Subproduto de manga |
| <i>L. fermentum</i> 141 | Subproduto de manga |
| <i>L. fermentum</i> 250 | Subproduto de abacaxi |
| <i>L. fermentum</i> 263 | Subproduto de abacaxi |
| <i>L. fermentum</i> 296 | Subproduto de morango |

3.2 PROPRIEDADES DE SEGURANÇA

3.2.1 Susceptibilidade a antibióticos

Os testes de resistência a antibióticos foram realizados determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) através do procedimento de micro diluição em caldo (GARCIA et al., 2016). Para isso, aproximadamente 100 µL de caldo MRS foram distribuídos em poços de

uma microplaca inoculados com 50 μL da cultura de cada cepa de *Lactobacillus* e, em seguida, suplementados com 50 μL de cada solução de antibiótico, sendo cloranfenicol, gentamicina, canamicina, eritromicina, tetraciclina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), preparados com concentrações finais de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 $\mu\text{g/mL}$, e ampicilina e clindamicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) em concentrações finais de 0.125, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$. Cada microplaca incluiu uma amostra inoculada sem antibiótico, uma amostra inoculada com antibiótico e uma amostra não inoculada como controle. Após a montagem das microplacas e passados 48 horas de incubação anaeróbica (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) a 37 °C, o crescimento bacteriano visível foi observado, e a CIM de cada antibiótico foi confirmada como sendo a mais baixa concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano visível. Os valores limites estabelecidos pela EFSA (2012) foram considerados para categorizar as cepas de *Lactobacillus* como sensíveis, se a CIM de um determinado antibiótico foi igual ou menor que os valores limites estabelecidos, ou resistentes, se a CIM foi maior do que os valores limites estabelecidos (EFSA, 2012).

3.2.2 Atividade hemolítica

Inicialmente, alíquotas de 10 μL das culturas de cada cepa de *Lactobacillus* foram transferidas para placas contendo ágar Sangue previamente preparadas utilizando ágar Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) com 5% (v/v) de sangue humano fresco, o qual foi adicionado ao ágar quando este atingiu a temperatura de 45 °C sob rigorosa agitação para evitar solidificação. Posteriormente, as placas foram incubadas por 48 horas a 30 °C em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK). Após o período de incubação, as placas foram examinadas quanto aos sinais de β -hemólise (zonas claras ao redor das colônias), α -hemólise (zonas esverdeadas ao redor das colônias) ou γ -hemólise (sem reação ao redor das colônias) (ARGYRI et al., 2013).

3.2.3 Degradação da mucina

A capacidade das cepas para degradar a mucina gástrica foi avaliada utilizando-se mucina gástrica de porco tipo III parcialmente purificada (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Para isso, 0.5% (p/v) de mucina foi adicionada a 1.2% (p/v) de ágar bacteriológico (HiMedia, Mumbai, Índia) na presença ou ausência de 3% (p/v) de glicose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). Então, alíquotas de 10 μL foram inoculadas na superfície do ágar com o uso da técnica de micro gota. As placas foram incubadas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen,

Oxoid, Hampshire, UK) a 37 °C durante 72 horas. Após o período de incubação, as placas foram coradas por 30 minutos com solução de amido negro [0.1% (p/v), Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) diluído em ácido acético a 3.5 M. Em seguida, as placas foram lavadas com ácido acético a 1.2 M e a formação de um halo descolorido em torno do crescimento foi considerado positivo para a capacidade das cepas de degradar mucina (ZHOU; GOPAL; HILL, 2001; MONTEAGUDO-MERA et al., 2012).

3.3 PROPRIEDADES DE FUNCIONALIDADES FISIOLÓGICAS

3.3.1 Tolerância a diferentes valores de pH

Para o desenvolvimento do teste, 1 mL das culturas de cada cepa de *Lactobacillus* foi inoculado em 10 mL de solução tampão fosfato (STF; 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄) esterilizada. O ajuste do pH foi feito com ácido clorídrico a 1 M para 2, 3 ou 5 com posterior incubação anaeróbica (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) sob agitação de 150 rpm em incubadora com agitação orbital (TECNAL TE-424, São Paulo, Brasil) a 37 °C por 48 horas. Em diferentes períodos de incubação (1, 2 e 3 horas), uma alíquota de 1 mL foi tomada da suspensão, diluída de forma seriada em 0.15% (p/v) de água de peptona esterilizada e inoculada em ágar MRS para enumeração da viabilidade celular. Após o período de incubação de 48 horas a 37 °C em anaerobiose, a contagem de células viáveis foi realizada e os resultados expressos em log de unidade formadora de colônia por mL (log UFC/mL). Como controle, as cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas em STF com pH 7.2 ajustado usando NaOH a 1 M (JACOBSEN et al., 1999; MONTEAGUDO-MERA et al., 2012).

3.3.2 Tolerância a diferentes concentrações de sais biliares

Inicialmente, uma alíquota de 1 mL das culturas de cada cepa de *Lactobacillus* foi inoculada em 10 mL de STF (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄) com concentrações de 0% (controle), 0.15%, 0.3% e 1% (p/v) de sais biliares (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). As suspensões foram incubadas a 37 °C por 48 horas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) sob agitação de 150 rpm em incubadora com agitação orbital (TECNAL TE-424, São Paulo, Brasil). Em diferentes períodos de incubação (1, 2 e 3 horas), uma alíquota de 1 mL foi removida de cada suspensão, diluída de forma seriada em 0.15% (p/v) de água de peptona esterilizada e inoculada em ágar MRS para enumeração da viabilidade celular. Após o período de incubação de 48 horas a 37 °C em anaerobiose, a

contagem de células viáveis foi realizada e os resultados foram expressos em log UFC/mL (JACOBSEN et al., 1999; MONTEAGUDO-MERA et al., 2012).

3.3.3 Desconjugação de sais biliares

Para avaliar a habilidade das cepas em desconjugar sais biliares, alíquotas de 10 µL das culturas de cada cepa de *Lactobacillus* foram transferidas para placas contendo ágar MRS preparadas previamente com 0.5% (p/v) de sais de sódio do ácido taurocólico ou sais de sódio do ácido glicocólico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), os quais foram incorporados ao ágar após a etapa de autoclavagem (121 °C por 15 min, 1 atm). Após a incubação em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) a 37 °C por 48 horas, a presença de um halo opaco ao redor das colônias foi considerado positivo para desconjugação de sais biliares (SANTOS et al., 2014).

3.3.4 Hidrofobicidade da superfície celular

A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana foi avaliada utilizando o procedimento descrito por Santos et al. (2015). Para isso, culturas de cada cepa de *Lactobacillus* foram centrifugadas (7,000 g × 5 min, 4 °C), lavadas duas vezes com STF (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄; pH 6.5) e ressuspensas em STF para alcance de valor de OD_{560nm} de 1.0 de absorbância (A₀). O solvente orgânico N-hexadecano (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) foi adicionado à suspensão de células na proporção de 1:5, e a mistura foi homogeneizada por 2 min utilizando vortex. A OD_{560nm} foi mensurada novamente (A) após 1 hora de incubação a 37 °C sob aerobiose. A hidrofobicidade da superfície celular foi calculada de acordo com a equação: % Hidrofobicidade = [(A₀-A)/A₀] × 100, onde A₀ refere-se aos valores de absorbância inicial e A refere-se aos valores de absorbância após 1 hora de incubação.

3.3.5 Autoagregação e coagregação com *L. monocytogenes* e *E. coli*

Para avaliar a capacidade de autoagregação, as células de cada cepa de *Lactobacillus* foram centrifugadas (7,000 g × 10 min, 20 °C), lavadas em solução salina (NaCl 0.85%, p/v) esterilizada, ressuspensas e diluídas também em solução salina para obter uma OD_{660nm} de 0.3 (absorbância). Em seguida, a suspensão foi incubada a 37 °C por 60 minutos e a OD_{660nm} registrada novamente. A autoagregação foi determinada usando a seguinte equação: % Autoagregação = [(OD₀-OD₆₀)/OD₀] × 100, onde OD₀ refere-se à OD inicial e OD₆₀ refere-se à OD determinada após 60 minutos (TODOROV et al., 2008).

A avaliação da coagregação entre cepas de *Lactobacillus* com *L. monocytogenes* (INCQS 00266, origem ATCC 7644) e *E. coli* (INCQS 00219, origem 8739) foi realizada inicialmente por meio da inoculação (1% v/v) em caldo MRS e caldo *Brain Heart Infusion* (BHI; HiMedia, Mumbai, Índia), respectivamente, e incubadas por 24 horas a 37 °C. Em seguida, as culturas foram centrifugadas (7,000 g × 10 min, 20 °C), lavadas em solução salina (NaCl 0.85%, p/v) esterilizada, ressuspensas e diluídas também em solução salina para cada suspensão alcançar uma OD_{660nm} de 0.3. Posteriormente, 750 µL da suspensão de cada cepa de *Lactobacillus* foram misturados com 750 µL da suspensão de *L. monocytogenes* ou *E. coli* por 30 segundos em vortex, e a OD_{660nm} foi registrada (OD₀). Após a incubação por 60 minutos a 37 °C sob aerobiose, a OD_{660nm} foi registrada novamente (OD₆₀). A coagregação foi calculada usando a seguinte equação: % Coagregação = [(OD₀–OD₆₀)/OD₀] × 100. OD₀ refere-se à OD inicial, mensurada imediatamente após a mistura das cepas, e OD₆₀ refere-se à OD determinada após os 60 minutos de incubação (TODOROV et al., 2008).

3.3.6 Atividade antagonista frente a patógenos

As cepas de *Lactobacillus* foram testadas frente às cepas indicadoras de *S. aureus* (INCQS 00015, origem ATCC 25923), *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium (INCQS 00150, origem ATCC 14028), *Salmonella enterica* subsp. Enteritidis (INCQS 00258, origem 13076), *L. monocytogenes* (INCQS 00266, origem ATCC 7644) e *E. coli* (INCQS 00219, origem 8739) utilizando-se as técnicas de *agar spot test* e difusão em poço. Para a realização dos testes, as cepas de *Lactobacillus* e bactérias indicadoras foram cultivadas (1%, v/v) em caldo MRS e caldo BHI, respectivamente, a 37 °C por 24 horas. As células de bactérias indicadoras foram centrifugadas (7,000 g × 10 min, 4 °C), lavadas em solução salina (NaCl 0.85%, p/v) esterilizada, ressuspensas e diluídas também em solução salina para a suspensão alcançar uma OD_{660nm} de 0.3 (contagem de células viáveis entre 7 – 8 log UFC/mL).

Para o *agar spot test*, uma alíquota de 10 µL das culturas com cada cepa de *Lactobacillus* foi transferida para superfícies de ágar MRS contendo 0.2% (p/v) de glicose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e 1.2% (p/v) de ágar bacteriológico (HiMedia, Mumbai, Índia) através da técnica de micro gota, seguindo-se por incubação anaeróbica (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) por 24 horas a 37 °C. Uma alíquota de 1 mL de cada suspensão de bactéria indicadora foi misturada com 18 mL de ágar BHI semissólido [contendo 0.7% (p/v) de ágar bacteriológico], e a mistura vertida sobre o ágar MRS inoculado anteriormente com a cepa de *Lactobacillus* testada. As placas foram novamente incubadas a 37 °C por 48 horas em aerobiose. A atividade antagonista foi registrada como o diâmetro (mm)

de halos de inibição de crescimento desenvolvido em torno de cada cultura de cepa *spot* (JACOBSEN et al., 1999). Ágar MRS não inoculado foi utilizado como controle negativo.

Para o método de difusão em poço, a partir do caldo MRS inoculado com a cepa de *Lactobacillus* testada, obteve-se o sobrenadante livre de células por meio de centrifugação (15,000 g × 15 min, 4 °C). Em seguida, uma alíquota de 1 mL de cada suspensão de bactéria indicadora foi incorporada em 20 mL de ágar BHI semissólido, e, então, 50 µL do sobrenadante livre de células obtidos da suspensão da cepa de *Lactobacillus* foram distribuídos em poços (5 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade, perfurados com cânulas de vidro esterilizadas) feitos no ágar BHI. As placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C por 48 horas. Após o período de incubação, a atividade antagonista foi registrada como o diâmetro (mm) dos halos de inibição de crescimento observados em torno de cada poço. Neste método, caldo MRS não inoculado foi utilizado como controle negativo em substituição ao sobrenadante livre de células (VITALI et al., 2012).

Em ambos os ensaios de *agar spot* e de difusão em poço, uma zona de inibição de crescimento livre com diâmetro superior a 1 mm (em torno do local ou do poço) foram considerados como atividade inibitória positiva (JACOBSEN et al., 1999). Todas as nove cepas de *Lactobacillus* foram testadas para a capacidade de inibir umas as outras.

3.3.7 Exposição a condições gastrointestinais simuladas

Após o crescimento de cada cepa de *Lactobacillus*, as culturas foram centrifugadas (7,000 g × 10 min, 4 °C), lavadas em solução salina (NaCl 0.85%, p/v) esterelizada, ressuspensas e diluídas em solução salina para a suspensão alcançar uma OD_{625nm} de 0.5 (absorbância; contagem inicial de células viáveis entre 6 – 7 log UFC/mL). Então, 1 mL da suspensão foi incorporado em frascos de vidro contendo 25 mL de caldo MRS, leite integral UHT (Cemil, Minas Gerais, Brasil ou suco de uva integral (Aurora, Rio Grande do Sul, Brasil) esterilizado por uso de autoclavagem (121 °C por 15 minutos, 1 atm).

O experimento foi realizado em fases que simularam a mastigação e condições no esôfago-estômago, duodeno e íleo (Tabela 1). As amostras iniciaram sendo expostas a condições simuladas da boca com o uso de 0.6 mL/min de α-amilase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), pH ajustado para 6.9 com NaHCO₃ a 1 M e tempo de exposição de 2 minutos a 200 rpm; do esôfago-estômago com o uso de 0.05 mL/mL de pepsina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), pH diminuído gradualmente usando HCl a 1 M (pH 5.5/10 minutos; pH 4.6/10 minutos; pH 3.8/10 minutos; pH 2.8/20 minutos; pH 2.3/20 minutos e pH 2.0/20 minutos) sob agitação de 130 rpm; do duodeno com o uso de 0.25 mL/mL de pancreatina (Sigma-Aldrich,

Saint Louis, EUA), 0.25 mL/mL de sais biliares bovino (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e tempo de exposição de 30 minutos sob agitação de 45 rpm, com pH ajustado para 5.0 com NaHCO₃ a 1 M; e, por fim, do íleo com tempo de exposição de 60 minutos sob agitação de 45 rpm e pH ajustado para 6.5 com NaHCO₃ a 1 M.

Durante todo o teste, as amostras foram mantidas em incubadora com agitação orbital (TECNAL TE-424, São Paulo, Brasil) a 37 °C para simular as condições de temperatura e peristaltismo do corpo humano. A simulação foi contínua, de modo que o volume de trabalho aumentou gradualmente a partir dos 25 mL da amostra inicial. O preparo das soluções com as enzimas foi realizado assepticamente, utilizando-se 100 U/mL de α -amilase diluída em 1mM de CaCl₂, 25 mg/mL de pepsina diluídas em HCl a 0.1 M, 2 g/L de pancreatina diluídas em NaHCO₃ a 0.1 M, e 12 g/L de sais biliares diluídos também em NaHCO₃ a 0.1 M. Todas as soluções foram mantidas sob refrigeração durante o período da simulação.

Após cada condição gastrointestinal simulada, uma alíquota de 100 μ L de caldo MRS, leite e suco de uva foi coletada e diluída seriadamente em solução salina (NaCl 0.85%, p/v) esterilizada. Em seguida, cada diluição foi transferida para placas contendo ágar MRS através da técnica de micro gota e incubadas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) a 37 °C por 48 horas. Após o período de incubação, a contagem de células viáveis foi realizada e expressa como log UFC/mL (OLIVEIRA et al., 2014; MEIRA et al., 2015). Amostras de caldo MRS, leite e suco de uva mantidas a 37 °C sem exposição a condições gastrointestinais simuladas foram usadas como controle. A detecção limite de 1 log CFU/mL foi usada nesses ensaios.

Tabela 1. Condições de exposição usadas durante cada fase da digestão simulada.

| Fase | Compartimento | Condição | Agitação (rpm) | pH final | Tempo de exposição (min) |
|-------------|----------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------------------|
| 1 | Boca | Saliva | 200 | 6.9 | 2 |
| 2 | Esôfago- Estômago | Pepsina | 130 | 5.5 | 10 |
| 3 | | | 130 | 4.6 | 10 |
| 4 | | | 130 | 3.8 | 10 |
| 5 | | | 130 | 2.8 | 20 |
| 6 | | | 130 | 2.3 | 20 |
| 7 | | | 130 | 2.0 | 20 |
| 8 | Duodeno | Pancreatina + sais biliares | 45 | 5.0 | 30 |
| 9 | Íleo | | 45 | 6.5 | 60 |

Fonte: adaptado de Oliveira et al. (2014).

3.4 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS

3.4.1 Atividade proteolítica

Para avaliação da atividade proteolítica, após o crescimento de cada cepa de *Lactobacillus* testada, uma alíquota de 10 µL das culturas foi transferida para placas contendo *plate count agar* (PCA; HiMedia, Mumbai, Índia) suplementado com 10% de leite desnatado sem lactose (Camponesa, Minas Gerais, Brasil) adicionado após a autoclavagem (121 °C por 15 minutos, 1 atm). As placas foram incubadas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) a 30 °C por 72 horas. A formação de um halo transparente ao redor das colônias foi considerada positiva para atividade proteolítica (FRANCIOSI et al., 2009; DOMINGOS-LOPES et al., 2017).

3.4.2. Atividade lipolítica

Para avaliação da atividade lipolítica, após o crescimento de cada cepa de *Lactobacillus* testada, uma alíquota de 10 µL das culturas foi transferida para placas contendo ágar Tributirina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), com posterior incubação anaeróbica (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) a 30 °C por 72 horas. Após a incubação, o aparecimento de uma zona clara ao redor das colônias foi interpretado como atividade lipolítica positiva para as cepas testadas (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007; DOMINGOS-LOPES et al., 2017).

3.4.3. Tolerância a NaCl

Após o crescimento, cada cepa de *Lactobacillus* testada foi transferida (3%, v/v) para tubos contendo caldo MRS com diferentes concentrações (1%, 2%, 3%, 4% ou 5%) de cloreto de sódio (NaCl) e para caldo MRS sem NaCl (controle), e incubadas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) a 37 °C. A contagem viável em caldo MRS com e sem NaCl foi determinada após 24 horas de incubação. Os resultados foram expressos como percentual de sobrevivência, isto é, a diferença entre a contagem viável observada no caldo MRS suplementado com cada concentração de NaCl em relação a observada no controle (DAS; KHOWALA; BISWAS, 2016). A detecção limite de 1 log CFU/mL foi usada nesses ensaios.

3.4.4 Produção de exopolissacarídeo (EPS)

A produção de EPS a partir dos isolados foi testada baseando-se nos métodos descritos por Van Geel-Schütten et al. (1998) e Almeida Júnior (2015). Cada cepa de *Lactobacillus* foi inoculada (1%, v/v) em 10 mL de caldo MRS contendo 2% de glicose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e incubadas a 37 °C durante três dias em condições anaeróbicas (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK). Após o período de incubação, as células bacterianas foram centrifugadas (6,000 g × 20 min, 20 °C) e misturadas em uma proporção de 1:2 com 95% (v/v) de etanol frio (Fmaia, Minas Gerais, Brazil; 4 °C) e armazenados por 24 horas a 4 °C para causar a precipitação de EPS. Os precipitados formados foram recolhidos por centrifugação (2,000 g × 15 min, 4 °C) e lavados com água destilada esterilizada. Após esse processo, os grânulos foram secos a 55 °C até peso constante. O peso seco (mg/L) foi mensurado para determinar a quantidade de EPS produzida por cada cepa testada.

3.4.5 Produção de diacetil

Após o crescimento, as células de cada cepa de *Lactobacillus* foram centrifugadas (4,000 g × 15 min, 4 °C) e o sedimento foi lavado e ressuspensão em solução salina (NaCl 0.85%, p/v) esterilizada. Posteriormente, 100 µL da suspensão foram inoculados em 10 mL de leite integral UHT (Cemil, Minas Gerais, Brasil), seguido de incubação a 37 °C por 24 horas. Então, 0.5 mL de KOH (16%, p/v) foi primeiramente adicionado a 1 mL da suspensão e homogeneizado. Em seguida, foi adicionado 0.5 mL de solução de α -naftol (1%, p/v), e incubado a 37 °C durante 10 minutos. A produção de diacetil foi indicada pela formação de um anel vermelho na superfície dos tubos (KING, 1948; ALMEIDA JÚNIOR et al., 2015). Os resultados foram classificados como fraco (+), médio (++) ou forte (+++) de acordo com a intensidade da cor do anel formado.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes, e os resultados foram expressos como média e desvio-padrão dos dados obtidos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para determinar diferenças estatísticas ($P \leq 0.05$), utilizando o software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia).

REFERÊNCIAS

- ADIMPONG, D. B. et al. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 75, p. 1-12, 2012.
- AHRÉN, I. L. et al. Antihypertensive activity of blueberries fermented by *Lactobacillus plantarum* DSM 15313 and effects on the gut microbiota in healthy rats. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 719-726, 2015.
- ALEGRE, I. et al. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 59-66, 2011.
- ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G. et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96-103, 2015.
- ALTAMIRANO-FORTOUL, R. et al. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 29, n. 1, p. 166-174, 2012.
- ANANDHARAJ, M. et al. Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 5, p. 428-439, 2015.
- ANANDHARAJ, M.; SIVASANKARI, B. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 153-159, 2014.
- ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 17-24, 2013.
- ANGMO, K. et al. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. **LWT – Food Science and Technology**, v. 66, p. 428-435, 2016.
- ANTUNES, A.E.C. et al. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. **LWT – Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 125-131, 2013.
- ARAGON-ALEGRO, L. C. et al. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 669-675, 2007.
- ARGYRI, A. A. et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 282-291, 2013.
- ARGYRI, A. A. et al. Preservation of green table olives fermented with lactic acid bacteria with probiotic potential under modified atmosphere packaging. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 783-790, 2015.
- ARIHARA, K. Functional Foods. **Reference Module in Food Science**, v. 1, n. 2, p. 32-36, 2014.

ARORA, T.; SINGH, S.; SHARMA, R. K. Probiotics: Interaction with gut microbiome and antiobesity potential. **Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 591-596, 2013.

AURELI, P. et al. Probiotics and health: An evidence-based review. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 5, p. 366–376, 2011.

AYENI, F. A. et al. Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 2, p. 97–104, 2011.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 54-66, 2011.

BAKR, S. A. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 423–431, 2015.

BALDISSERA, A. C. et al. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas proteicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1497-1512, 2011.

BASTOS, G. A. PAULO, E. M.; CHIARADIA, A. C. N. Acceptability of potentially probiotic cereal bars. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 113-120, 2014.

BAUR, C. et al. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 49, n. 1, p. 23-29, 2015.

BAUTISTA-GALLEGO, J. et al. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International**, v. 50, n.1, p. 135–142, 2013.

BEDANI, R. et al. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 436-443, 2014.

BELGACEM, Z. B. et al. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 462-470, 2010.

BEZERRA, M. et al. Caprine frozen yoghurt produced with fresh and spray dried jambolan fruit pulp (*Eugenia jambolana* Lam) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-07. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 1099-1104, 2015.

BEZERRA, T. K. A. et al. Effect of supplementation with probiotic lactic acid bacteria, separately or combined, on acid and sugar production in goat 'coalho' cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 710–718, 2017.

BORRE, Y. E. et al. The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms and therapeutic potential. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 817, p. 373–403, 2014.

BOURDICHON, F. et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **International Journal Food Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 87–97, 2011.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticas: Lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas. Brasília, DF, 22 de dezembro de 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2017.

BREMER, E.; KRAMER, R. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: STORZ, G.; HENGGE-ARONIS, R. (Eds.), **Bacterial stress responses**. Washington: ASM Press Published, p. 79-97, 2000.

BRITTON, R. A. et al. Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized mouse model. **Journal of Cell Physiology**, v. 229, n. 11, p. 1822–1830, 2014.

BURITI, F. C. A.; KOMATSU, T. R.; SAAD, S. M. I. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 315–317, 2007.

BURNS, P. et al. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheeses. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 45-50, 2012.

BUSTOS, P.; BÓRQUEZ, R. Influence of osmotic stress and encapsulating materials on the stability of autochthonous *Lactobacillus plantarum* after spray drying. **Drying Technology**, v. 31, n. 1, p. 57-66, 2013.

CAILLARD, R.; LAPOINTE, N. *In vitro* gastric survival of commercially available probiotic strains and oral dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 125–127, 2017.

CAMPANELLA, D. et al. Exploitation of grape marc as functional substrate for lactic acid bacteria and bifidobacteria growth and enhanced antioxidant activity. **Food Microbiology**, v. 65, p. 25–35, 2017.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p. 539–543, 2008.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n. 1, p. 61-84, 2005.

CHAN, E.S.; ZHANG, Z. Bioencapsulation by compression coating of probiotic bacteria for their protection in anacidic medium. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3346–3351, 2005.

CHEN, M.; MUSTAPHA, A. Survival of freeze-dried microcapsules of α -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 68–73, 2012.

- CHIANG, S.S.; PAN, T.M. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 903-916, 2012.
- CHINGWARU, W.; VIDMAR, J. Potential of Zimbabwean commercial probiotic products and strains of *Lactobacillus plantarum* as prophylaxis and therapy against diarrhoea caused by *Escherichia coli* in children. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 10, n. 1, p. 57–63, 2017.
- CHOI, E. A.; CHANG, H. C. Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 210-217, 2015.
- CHONAN, O. FOSHU Japanese regulations for probiotic foods. In: TAKEDA, Y. (Eds.) **Probiotic foods in health and disease**. Science publishers. Enfield, USA: CRC Press, p. 33-40, 2011.
- COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 5, p. 1065–1073, 2008.
- COOK, M.T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v.162, n. 1, p.56-67, 2012.
- CORBO, M. R. et al. Selection of wild lactic acid bacteria for sausages: Design of a selection protocol combining statistic tools, technological and functional properties. **LWT – Food Science and Technology**, v. 81, p. 144-152, 2017.
- COSTA, M. G. M. et al. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 261–266, 2013a.
- COSTA, H. H. S. et al. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo de minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1858-1866, 2013b.
- COSTA, G. M. et al. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 195–201, 2017.
- COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais: componentes bioativos e efeitos**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Rubio, p. 199-201, 2010.
- COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 777–788, 2005.
- CRUXEN, C. E. S. et al. Probiotic butiá (*Butia odorata*) ice cream: Development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 379-385, 2017.

- CRUZ, A. G. et al. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 8, p. 344–54, 2009a.
- CRUZ, A. G. et al. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1233 -1238, 2009b.
- DAS, D.; GOYAL, A. Antioxidant activity and g-aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 263-268, 2015.
- DAS, P.; KHOWALA, S.; BISWAS, S. In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 383-390, 2016.
- DEL CARMEN, S. et al. Potential application of probiotics in the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases, **Ulcers**, v. 2011, p. 1-13, 2011.
- DEMIRBAS, F. et al. Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 361–366, 2017.
- DESHPANDE, G. et al. M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. **Pediatrics**, v. 125, n. 5, p. 921– 930, 2010.
- DI CAGNO, R. et al. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 381–389, 2010.
- DIAS, M. et al. Epiphytic bacteria biodiversity in brazilian cerrado fruit and their cellulolytic activity potencial. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 851-864, 2014.
- DIMITRELLOU, D. et al. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 169-174, 2016.
- DING, W. K.; SHAH, N. P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v. 15, n. 2, p. 219–232, 2008.
- DOBSON, A. et al. Bacteriocin production: a probiotic trait? **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 1, p. 106, 2012.
- DOMINGOS-LOPES, M. F. P. et al. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 178-190, 2017.
- DRAGO, L. et al. Changing of fecal flora and clinical effect of *L. salivarius* LS01 in adults with atopic dermatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 46, p. 56-63, 2012.

DUARTE, M. C. K. H. et al. *Lactobacillus acidophilus* antagonistic action against pathogenic strains inoculated in the fermented milk. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2016.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion of the panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the updating of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, n. 6, p. 1-10, 2012.

ESPÍRITO-SANTO, A. P. et al. Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 415–422, 2010.

ESPÍRITO-SANTO, A. P. et al. Influence of milk type and addition of passion fruit peel powder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 393-399, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome: **FAO food and nutrition paper**. N° 85, 2006.

FRANCIOSI, E. et al. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 3-11, 2009.

FRANZ, C. M. A. P. et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal Food Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 125–140, 2011.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT- Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 39-44, 2013.

FU, N.; CHEN, X. D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1127-1149, 2011.

GANESAN, B. et al. Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 6, p. 1642–1656, 2014.

GARCIA, E. F. et al. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing by products and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1371-1382, 2016.

GARCÍA-RUIZ, A. et al. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. **Food Microbiology**, v. 44, p. 220-225, 2014.

GAYATHRI, D.; RASHMI, B. S. Mechanism of development of depression and probiotics as adjuvant therapy for its prevention and management. **Mental Health & Prevention**, v. 5, p. 40–51, 2017.

- GE, X. Y. et al. Improvement of L-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 73-78, 2011.
- GEBARA, C. et al. Effectiveness of different methodologies for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* La5 from yoghurt and Prato cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n.1, p. 508-513, 2015.
- GEISSLER, A. J. et al. Metabolic strategies of beer spoilage lactic acid bacteria in beer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 216, p. 60–68, 2016.
- GHEYTANCHI, E. et al. Study on β -galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 6, p. 454-458, 2010.
- GIRAFFA, G. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 391-398, 2012.
- GRANATO, D. et al. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292-302, 2010.
- GREGORET, V. et al. A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 19–28, 2013.
- GROSU-TUDOR, S. S. et al. Isolation of novel homopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from Romanian raw milk and fermented dairy products. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 4, p. 609-615, 2013.
- GUERRA, A. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.
- HAMET, M. F.; PIERMARIA, J. A.; ABRAHAM, A. G. Selection of EPS-producing *Lctobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 129-135, 2015.
- HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7162-7168, 2007.
- HASLER, C. M. Functional foods: benefits, concerns and challenges-a position paper from the American council on science and health. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 12, p. 3772-3781, 2002.
- HEIJTZ, D.R. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 108, n. 7, p. 3047–3052, 2011.
- HUANG, C-H. et al. The probiotic activity of *Lactobacillus murinus* against food allergy. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 231–241, 2016.

IBRAHIM, F. et al. Probiotics and immunosenescence: Cheese as a carrier. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 53–59, 2010.

ILHA, E. C. et al. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **European Food Research Technology**, v. 240, n. 5, p. 977–984, 2015.

JACOBSEN, C. N. et al. 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**, v. 65, n. 11, p. 4949–4956, 1999.

JANKOVIC, T. et al. Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **International Journal of Sanitary Engineering Research**, v. 6, n. 1, p. 19–24, 2012.

JAY, J. M. LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7^a ed. New York: Springer, p. 175–195, 2005.

JI, Y. et al. Functionality and safety of lactic bacterial strains from Korean kimchi. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 467–473, 2013.

JOSHI, S.R.; KOIJAM, K. Exopolysaccharide production by a lactic acid bacteria, *Leuconostoc lactis* isolated from ethnically fermented beverage. **National Academy Science Letters**, v. 37, n. 1, p. 59–64, 2014.

JUNG, S. et al. Supplementation with two probiotic strains, *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032, reduced body adiposity and Lp-PLA2 activity in overweight subjects. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 744–752, 2015.

KANG, J. H. et al. Antiobesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet induced obese mice. **PLoS One**, v. 8, n. 1, 2013.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; CRUZ, A. G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: A review. **Dairy Science & Technology**, v. 91, n. 3, p. 283–308, 2011.

KAUSHANSKY, K. et al. **Williams Hematology**. 8^a Ed. The McGraw-Hill Companies, p. 346–358, 2010.

KAUSHIK, J. K. et al. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. 8099, 2009.

KHAN, I.; KANG, S. C. Probiotic potential of nutritionally improved *Lactobacillus plantarum* DGK-17 isolated from Kimchi, a traditional Korean fermented food. **Food Control**, v. 60, p. 88–94, 2016.

KHAN, M. I. et al. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. **Food Research International**, v. 44, n. 10, p. 3125–3133, 2011.

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

KLEWICKA, E.; ZDUNCZYK, Z.; JUSKIEWICZ, J. Effect of *Lactobacillus* fermented beetroot juice on composition and activity of cecal microflora of rats. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 1, p. 153–157, 2009.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, 2008.

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

KRISTENSEN, N. B. et al. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. **Genome Medicine**, v. 8, p. 52-63, 2016.

KUMAR, A.; KUMAR, D. Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. **Anaerobe**, v. 33, p. 117-123, 2015.

KUMAR, M. et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 902-917, 2012.

LAHTINEN, S. J. et al. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM modifies subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly. **Age (Dordrecht, Netherlands)**, v. 34, n. 1, p. 133–143, 2012.

LANDETA, G. et al. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. **Meat Science**, v. 95, n. 2, p. 272–280, 2013.

LANDMAN, C.; QUÉVRAIN, E. Gut microbiota: description, role and pathophysiologic implications. **La Revue Médecine Interne**, v. 37, n. 6, p. 418-423, 2016.

LEANDRO, E. S. et al. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 in ice cream produced with different fat levels and after submission to stress acid and bile salts. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 503-507, 2013.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 171–184, 2010.

LEE, K. W. et al. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, a traditional Korean fermented vegetable. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 130-137, 2016.

- LEITE, O. et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3622–3632, 2015.
- LOLLO, P.C.B. et al. Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in wistar rats. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3549–3558, 2012.
- LOLLO, P. C. B. et al. Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. **Food Research International**, v. 76, n. 3, p. 611-617, 2015.
- MAHAPATRA, S; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1–16, 2013.
- MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 4, p. 1199-1208, 2007.
- MAKINEN, K. et al. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 356– 365, 2012.
- MANINI, F. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 275-283, 2016.
- MARROKI, A.; BOUSMAHA-MARROKI, L. *Lactobacilli* isolated from Algerian goat's milk as adjunct culture in dairy products. **Brazilian Archives of Biology And Technology**, v. 57, n. 3, p. 410-420, 2014.
- MARTINS, E. M. F. et al. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 764-770, 2013.
- MAYO, B. et al. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: MOZZI, F.; RAYA, R.R.; VIGNOLO, G.M. (Eds.), **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. 1ª Ed. Blackwell Publishing, USA, p. 3-33, 2010.
- MEIRA, Q. G. S. et al. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**. v. 76, n. 3, p. 828–838, 2015.
- MENEZES, C.R.; DURRANT, L.R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v.38, n. 2, p.587-592, 2008.
- MIREMADI, F. et al. Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 295–305, 2014.
- MIREMADI, F.; SHERKAT, F.; STOJANOVSKA, L. Hypocholesterolaemic effect and anti-hypertensive properties of probiotics and prebiotics: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 497-510, 2016.

MOJGANI, N.; HUSSAINI .F.; VASEJI, N. Characterization of indigenous *Lactobacillus* strains for probiotic properties. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 1–2, 2015.

MONTEAGUDO-MERA, A. et al. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p. 531–541, 2012.

MOUSAVI, Z. E. et al. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 123–128, 2011.

MU, C.; YANG, Y.; ZHU, W. Gut microbiota: the brain peacekeeper. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 345, p. 1-11, 2016.

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

NAEEM, M. et al. Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 1, p. 323–328, 2012.

NEMATOLLAHI, A. et al. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 49–53, 2016.

NICCOLI, A. A. et al. Preliminary results on clinical effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* LS01 in children affected by atopic dermatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 48, n. 1, p. 34-36, 2014.

NICOLESCO, C. L.; BURULEANU, L. C. Correlation of some substrate parameters in growing *Lactobacillus acidophilus* on vegetable and fruit cocktail juices. **Bulletin UASVM Agriculture**, v. 67, n. 2, p. 352–359, 2010.

NOORBAKSH, R.; YAGHMAEE, P.; DURANCE, T. Radiant energy under vacuum (REV) technology: A novel approach for producing probiotic enriched apple snacks. **Journal of Functional Foods**, v.5, n. 3, p. 1049–1056, 2013.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 111–117, 2011.

OGUNTOYINBO, F. A.; NARBAD, A. Multifunctional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from fermented cereal foods. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 621–631, 2015.

OH, Y.J.; JUNG, D.S. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 437–444, 2015.

OHLSSON, C. et al. Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014.

OLIVEIRA, M. E. G. et al. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241–247, 2014.

OLIVEIRA, D. et al. Sensory, microbiological and physicochemical screening of probiotic cultures for the development of non-fermented probiotic milk. **LWT - Food Science and Technology**, v.79, p. 234–241, 2017.

OOI, L. G.; LIONG, M. T.: Cholesterol lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and vitro findings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 6, p. 2499-2522, 2010.

ORTIZ-RIVERA, Y. et al. Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, in press, 2017.

OUALI, F. A. et al. Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 116–124, 2014.

OZYURT, V. H.; OTLES, S. Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 13, n. 4, p. 413-424, 2014.

PAGNINI, C. et al. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 1, p. 454-459, 2010.

PANICKER, A. S.; BEHARE, P. V. Evaluation of bile tolerance in dairy and human origin *Lactobacillus fermentum* strains. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 5, p. 421-425, 2014.

PANWAR, H. et al. Identification of lactic acid bacteria strains modulating incretin hormone secretion and gene expression in enteroendocrine cells. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 348–358, 2016.

PAPANIKOLAOU, Z. et al. Selection of dominant NSLAB from a mature traditional cheese according to their technological properties and in vitro intestinal challenges. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 5, p. 298-306, 2012.

PATEL, A.; PRAJAPATI, J. B. Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Advances in Dairy Research**, vol. 1, n. 2 p. 100-107, 2013.

PATRICK, O.M. Lactic acid bacteria in health and disease. **Rwanda Journal of Health Sciences**, v.1, n.1, p. 39- 50, 2012.

- PATTEN, D. A. et al. The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the EPSs isolated from *Lactobacillus helveticus* sp. Rosyjski and *Lactobacillus acidophilus* sp. 5 e 2. **Carbohydrate Research**, v. 384, p. 119-127, 2014.
- PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1276–1283, 2011.
- PERIN, L. M. et al. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 121–126, 2014.
- PESAVENTO, G. et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready to-eat salads, ham, and raw meat. **Food Microbiology**, v. 41, p. 1-7, 2014.
- PEYER, L. C.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal based beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 17-25, 2016.
- PIMENTEL, T. C. et al. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 415-422, 2015.
- PIRAINO, P. et al. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 1, p. 81-92, 2008.
- POSSEMIERS, S. et al. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1–2, p. 97–103, 2010.
- QUIGLEY, E. M. M. Basic Definitions and concepts: organization of the gut microbiome. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 46, n. 1, p. 1–8, 2017.
- RANADHEERA, C. S. et al. *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, n. 2, p. 619–625, 2012.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1–7, 2010.
- REALE, A. et al. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 721-728, 2015.
- REN, D. et al. *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. **Anaerobe**, v. 30, p. 1-10, 2014.

ROBLE, C. et al. Evaluation of fresh-cut apple slices with probiotic bacteria. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 203-209, 2010.

RUIZ-MOYANO, S. et al. Application of *Lactobacillus fermentum* HL57 and *Pediococcus acidilactici* SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 839-847, 2011.

RUSSO, P. et al. Probiotic lactic acid bacteria for the production of multifunctional fresh-cut cantaloupe. **Food Research International**, v. 77, n. 4, p. 762-772, 2015.

SAAD, N. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2013.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SADE, E.; LASSILA, E.; BJORKROTH, J. Lactic acid bacteria in dried vegetables and spices. **Food Microbiology**, v. 53, p. 110-114, 2016.

SAGDIC, O. et al. Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberry bush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. **Food Research International**, v. 64, p. 537-545, 2014.

SALMERÓN, I.; THOMAS, K.; PANDIELLA, S. S. Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 106-115, 2015.

SALVUCCI, E.; LEBLANC, J. G; PÉREZ, G. Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 185-191, 2016.

SANDERS, M. E. Impact of probiotics on colonizing microbiota of the gut. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. 3, p. 115-119, 2011.

SANTOS, K. M. O. et al. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: Characterization of the bacteriocinogenic potential. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1463-1471, 2014.

SANTOS, K. M. O. et al. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science & Technology**, v. 95, n. 2, p. 209-230, 2015.

SAXAMI, G. et al. Two potential probiotic *Lactobacillus* strains isolated from olive microbiota exhibit adhesion and anti-proliferative effects in cancer cell lines. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 461-471, 2016.

SCHIRRU, S. et al. Sardinian goat's milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 309-320, 2012.

SELHUB, E.M.; LOGAN, A.C.; BESTED, A.C. Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 32, n. 2, p. 1-12, 2014.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, n. 11, p.1262-1277, 2007.

SHARMA, P. et al. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp isolated from commercial probiotic preparations. **Journal of Food Safety**, v. 36, n. 1, p. 38-51, 2016.

SHEEHAN, V.M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G.F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 8, n. 2, p. 279–284, 2007.

SHEELA, T.; SUGANYA, R. S. Studies on anti-diarrhoeal activity of symbiotic plums juice. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, n. 2, p. 1–5, 2012.

SHEHATA, M. G. et al. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. **Annals of Agricultural Science**, v. 61, n. 1, p. 65–75, 2016.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1–8, 2016.

SIGMA STAT 3.5. Jandel Scientific Software, 1980.

SILVA, P. D. L. et al. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 452-457, 2015.

SINGH, A. K. et al. Probiotic activities of lactic acid bacteria isolated from human breast milk. **Journal of Biological Engineering Research & Review**, v. 1, n. 2, p. 07-12, 2014.

SOCCOL, C. R. et al. The potential of probiotics. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

SOHAIL, A. et al. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 162-166, 2012.

SOLIERI, L. et al. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. **Food Microbiology**, v. 38, p. 240-249, 2014.

SPYROPOULOS, B. et al. Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation induced Enteritis and Colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 2, p. 285-294, 2011.

STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G.; MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. **Food Microbiology**, v. 61, p. 33-49, 2017.

- STRINGHETA, P. C. et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.
- SUN, Z. et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. **Nature Communications**, v. 6, p. 1-13, 2015.
- TAMBEKAR, D. H. et al. Assessment of potential probiotic bacteria isolated from milk of domestic animals. **Journal of Applied Biosciences**, v. 15, p. 815–819, 2009.
- TAMBEKAR, D.H.; BHUTADA, S.A. An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. **Recent Research in Science and Technology**, v. 2, n. 10, p. 82-88, 2010.
- THOMAS, P.; SOLY, T. A. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. Grand naine and the affinity of endophytes to the host. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 952–964, 2009.
- TODOROV, S. D. et al. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 465–477, 2008.
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 2014.
- TULUMOGLU, S. et al. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. **Anaerobe**, v. 24, p. 36-42, 2013.
- TULUMOGLU, S.; KAYA, H. I.; SIMSEK, O. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. **Anaerobe**, v. 30, p. 120-125, 2014.
- TUO, Y. et al. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. **Journal Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4252–4257, 2013.
- UCCELLO, M. et al. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. **BMC Surgery**, v. 12, n. 1, p. 35-41, 2012.
- VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H. et al. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 6, p. 697-703, 1998.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.
- VENTURA, M. et al. Genome-scale analyses of health promoting bacteria: probiogenomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 61-73, 2009.
- VESTERLUND, S. et al. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 325 – 331, 2007.

- VIJAYAKUMAR, M. et al. In-vitro assessment of the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* KCC-24 isolated from Italian rye-grass (*Lolium multiflorum*) forage. **Anaerobe**, v. 32, p. 90–97, 2015.
- VITALI, B. et al. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 116-125, 2012.
- WANG, J. et al. Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 1645–1654, 2012.
- WEICHSELBAUM, E. Probiotics and health: a review of the evidence. **Nutrition Bulletin**, v. 34, n. 4, p. 340-373, 2009.
- WU, C. et al. *Lactobacillus casei* combats acid stress by maintaining cell membrane functionality. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 1031-1039, 2012.
- YANG, J. et al. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 3136–3145, 2010.
- YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 12, p. 1427–1430, 2006.
- ZDOLEC, N. et al. Selection and application of autochthonous functional starter cultures in traditional Croatian fermented sausages. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2013.
- ZHANG, H. et al. The association of biofilm formation with antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented foods. **Journal of Food Safety**, v. 33, n. 2, p. 114-120, 2013.
- ZHANG, J. et al. Potential probiotic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from inner Mongolia “Hurood” cheese. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 225-235, 2014.
- ZHONG, L.; ZHANG, X.; COVASA, M. Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 24, p. 7878–7886, 2014.
- ZHOU, J. S.; GOPAL, P. K.; HILL, H. S. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, n. 1-2, p. 81–90, 2001.

APÊNDICES

APÊNDICE A

***In vitro* characterization of wild *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts for use as probiotics**

Running title: Fruit derived-lactobacilli as potential probiotics

Abstract

Nine wild *Lactobacillus* strains, namely *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 56, *L. fermentum* 60, *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 250, *L. fermentum* 263, *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 141 and *L. fermentum* 296, isolated from fruit processing byproducts were evaluated *in vitro* for a series of safety, physiological functionality and technological properties that could enable their use as probiotics. Considering the safety aspects, the resistance to antibiotics varied among the examined strains, and none of the strains presented hemolytic and mucinolytic activity. Regarding the physiological functionality properties, none of the strains was able to deconjugate bile salts; all of them presented low to moderate cell hydrophobicity, were able to autoaggregate, coaggregate with *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* and antagonize pathogenic bacteria. The exposure to pH 2 sharply decreased the survival of the examined strains after 1 or 2 h-exposure; variable decreases were noted after 3 h-exposure to pH 3. Overall, the exposure to pH 5 and to bile salts (0.15, 0.3 and 1%) did not decrease the survival of the examined strains. The examined strains presented better ability to survive the exposure to simulated gastrointestinal conditions in laboratorial media and milk than in grape juice. Considering the technological properties, all the strains were positive for proteolytic activity, EPS and diacetyl production, and most of them had good tolerance to 1 - 4% NaCl. These results indicate that wild *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts could be candidates for use as new probiotics.

Keywords: fruit, agroindustrial byproducts, *Lactobacillus*, probiotic use.

1. Introduction

Different investigations have supported the importance of including foods carrying probiotics as part of a healthy diet (Angmo et al., 2016; Oh and Jung, 2015). Probiotics are living organisms that when ingested at appropriate amounts are capable of exerting benefits to

host health (FAO/WHO, 2006). Although a high number of probiotic lactic acid bacteria (LAB) strains have been characterized, the search for new probiotic strains remains of interest because of the wide use possibilities of these microorganisms, especially their incorporation into food matrices (Ilha et al., 2015; Salvucci et al., 2016). Among the LAB, the *Lactobacillus* genus has been intensively studied for the selection of probiotic species and strains (Argyri et al., 2013; Sun et al., 2015).

During the selection process of probiotic strains for potential applications, several aspects need to be considered. These include safety for the consumer (e.g., antibiotic susceptibility, hemolytic activity and mucin degradation), physiological functionalities (e.g., acid and bile salts tolerance, bile salts deconjugation, cell surface hydrophobicity, autoaggregation, coaggregation with pathogens and antagonistic activity against pathogens) and capability of surviving during exposure to gastrointestinal conditions. Additionally, technological aspects (e.g., proteolytic and lipolytic activity, tolerance to NaCl, exopolysaccharide and diacetyl production) that can influence the food stability and quality should be considered (Saarela et al., 2000; Tripathi and Giri, 2014).

The *Lactobacillus* strains traditionally used as probiotics are often from human or animal origin because these kinds of strains should be better adapted to conditions of the human gastrointestinal tract (Monteagudo-Mera et al., 2012; Toscano et al., 2017). Although studies have shown good performance of *Lactobacillus* isolated from natural or fermented vegetables in *in vitro* tests for selection of probiotics (Di Cagno et al., 2010; Dias et al., 2014; Ilha et al., 2015; Naeem et al., 2012; Vitali et al., 2012), information on the probiotic properties of *Lactobacillus* isolated from fruit or their processing byproducts are still scarce.

Fruit are typically acidic foods, and this characteristic is considered the main factor driving the selection of the predominant microflora of fruit since the acidic condition inhibits the survival of most of the spoiling and (phyto) pathogenic microorganisms that colonize their surface (Naeem et al., 2012; Sheehan et al., 2007). The byproducts generated during the fruit processing preserve many of the intrinsic fruit characteristics, in addition to harbouring a variety of microorganisms of potential interest to food industry, especially *Lactobacillus* (Ayala-Zavala et al., 2011; Garcia et al., 2016). The natural adaptation to the intrinsic characteristics of fruit, primarily the acidity and presence of phenolics with antimicrobial properties, may influence positively the survival of *Lactobacillus* of fruit origin during the food processing and storage, as well as during exposure to the harsh acidic conditions of the gastrointestinal human tract (Garcia et al., 2016; Nematollahi et al., 2016). The detection of potential probiotic properties in *Lactobacillus* of fruit processing byproducts origin may

greatly add value to these agroindustrial byproducts that are already recognized as sources of bioactive phytochemicals (e.g., antioxidants) and prebiotic ingredients (Andrade et al., 2015; Duarte et al., 2017; Sancho et al., 2015).

This study assessed *in vitro* if wild *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts present safety, physiological functionality and technological properties that may enable their use as potentially probiotic strains.

2. Material and methods

2.1 Test strains and inoculum preparation

Nine strains of *Lactobacillus* species that were previously isolated from byproducts of fruit pulp processing (Garcia et al., 2016) were tested *in vitro* for a series of safety, physiological functionality and technological properties proposed by relevant guidelines (FAO/WHO, 2006) and previous studies for selection of LAB for use as probiotics (Das et al., 2016; Domingos-Lopes et al., 2017; Monteagudo-Mera et al., 2012; Santos et al., 2015). The examined strains were *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 56 and *L. fermentum* 60 that were isolated from byproducts of *Malpighia glabra* L. - barbados cherry; *L. paracasei* 106 that was isolated from byproducts of *Annona muricata* L. – soursop; *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 141 that were isolated from byproducts of *Mangifera indica* L. – mango; *L. fermentum* 250 and *L. fermentum* 263 that were isolated from byproducts of *Ananas comosus* L. – pineapple; and *L. fermentum* 296 that was isolated from byproducts of *Fragaria vesca* L. (strawberry) (Garcia et al., 2016). These strains were identified using 16S rRNA gene sequence analysis (Garcia et al., 2016). Stocks were stored at –20 °C in Mann, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 20 mL/100mL). Working cultures were maintained aerobically on MRS agar (HiMedia, Mumbai, India) at 4 °C, and transferred to a new media monthly. Prior the use in assays, each strain was cultivated anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) in MRS broth at 37 °C for 20 – 24 h (stationary growth phase). These cultures provided viable counts in the range of 7 – 8 log cfu/mL when pour plated onto MRS agar.

Strains of *Staphylococcus aureus* (INCQS 00015, originally ATCC 25923), *Salmonella* Typhimurium (INCQS 00150, originally ATCC 14028), *Salmonella* Enteritidis (INCQS 00258, originally 13076), *Listeria monocytogenes* (INCQS 00266, originally ATCC 7644) and *Escherichia coli* (INCQS 00219, originally ATCC 8739) used in assays of antagonistic activity and/or coaggregation were obtained from the National Institute for Quality Control in

Health (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil). Stocks were stored in Brain Heart Infusion (BHI) broth (HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 20 mL/100 mL) at -20 °C. Prior to use in assays, each strain was aerobically grown in BHI broth at 37 °C for 20 – 24 h (stationary growth phase). These suspensions provided viable cell counts in the range of 7 – 8 log cfu/mL.

2.2 Safety properties

2.2.1 Antibiotic susceptibility testing

The minimum inhibitory concentration (MIC) of ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin and tetracycline (EFSA, 2012) against the *Lactobacillus* strains were determined using a microdilution in broth test (Garcia et al., 2016). Approximately 50 µL-aliquots of each antibiotic solution were dispensed into wells of a 96-well microplate containing 100 µL of MRS broth. Subsequently, a 50 µL-aliquot of the examined strain grown anaerobically in MRS (20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) was added to each well. The microplate was loosely wrapped with cling wrap to prevent bacterial dehydration. Each plate included an inoculated sample without antibiotic, an inoculated sample with antibiotic and an uninoculated sample as controls. The system was anaerobically incubated at 37 °C for 48 h. Subsequently, the bacterial growth was visually observed, and the MIC of each antibiotic was confirmed as the lowest concentration capable of inhibiting visible bacterial growth. The MIC cut-off values of EFSA (2012) were considered to categorize the strains as susceptible or resistant to each tested antibiotic. Each strain was defined as susceptible when it was inhibited at a concentration (µg/mL) of a specific antibiotic equal to or lower than the established cut-off value, and as resistant when it was inhibited at a concentration (µg/mL) of a specific antibiotic higher than the determined cut-off value (EFSA, 2012).

2.2.2 Hemolytic activity

Ten-µL aliquots of each *Lactobacillus* strain anaerobically grown (20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) in MRS broth were streaked onto blood agar [Mueller Hinton agar (HiMedia, Mumbai, India) with 5% (v/v) fresh human blood] and incubated anaerobically at 30 °C for 48 h. After the incubation period, the blood agar plates were examined to the presence of signs of β-hemolysis (clear zones surrounding the colonies), α-hemolysis (green-hued zones surrounding the colonies) or γ-hemolysis (no zones around colonies) (Argyri et al., 2013).

2.2.3 Mucin degradation

The capacity of the *Lactobacillus* strains to degrade gastric mucin was assessed using partially purified pig gastric mucin type III (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). For this, 0.5% (w/v) mucin was incorporated into bacteriological agar (1.2%, w/v) plates with and without 3% (w/v) glucose. Ten- μ L aliquots of each *Lactobacillus* strain grown anaerobically (20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) in MRS broth were spot inoculated onto the plates, and incubated anaerobically at 37 °C for 72 h. At the end of the incubation period, the agar plates were stained with 0.1% (w/v) amido black (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 3.5 M acetic acid for 30 min and thereafter washed with 1.2 M acetic acid. The appearance of a clear zone surrounding the colonies was considered positive for mucinolytic property (Monteagudo-Mera et al., 2012; Zhou et al., 2001).

2.3 Physiological functionality properties

2.3.1 Acid and bile salts tolerance

The tolerance to different pH values and bile salt concentrations was assessed by inoculating 1 mL-aliquots of each tested *Lactobacillus* strain (grown anaerobically in MRS broth; 20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) in 10 mL PBS (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4) with pH adjusted to 2, 3 or 5 using 1 M HCl or supplemented with 0.15, 0.3 or 1% (w/v) bile salts (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The mixtures were incubated anaerobically at 37 °C under stirring (150 rpm). At different incubation time intervals (1, 2 and 3 h), 1 mL-aliquots were removed from each mixture, serially diluted in sterile peptone (0.15 g/100 mL) water and spread plated onto MRS agar for enumeration of viable cells. After an incubation period of 48 h at 37 °C under anaerobiosis, the viable cells were counted and the results were expressed as the log cfu/mL. For controls, *Lactobacillus* strains were cultivated in PBS with pH 7.2 adjusted using 1 M NaOH and in MRS without bile salts (Jacobsen et al., 1999; Monteagudo-Mera et al., 2012).

2.3.2 Bile salts deconjugation

Initially, 10 μ L-aliquots of each tested *Lactobacillus* strain (grown anaerobically in MRS broth; 20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) were streaked onto MRS agar supplemented with 0.5% (w/v) sodium salt of taurodeoxycholic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) or glycodeoxycholic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The plates were incubated anaerobically at 37 °C for 48 h. The appearance of opaque

zones surrounding the colonies was considered positive for bile salts desconjugation (Santos et al., 2014).

2.3.3 Cell surface hydrophobicity

Lactobacillus cells grown anaerobically in MRS broth (20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) were centrifuged (7,000 g × 5 min, 4 °C), washed twice and resuspended in PBS (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 6.5) to achieve an OD at 560 nm of 1.0, named A560 value (A0). N-hexadecane (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was mixed (1:5) with the cell suspension and vortexed for 2 min. After a 1 h-incubation at 37 °C, the A560 value (A) of the formed aqueous layer was measured again. The cell surface hydrophobicity was calculated using the equation: %H = [(A0–A)/A0] × 100; where A0 and A refer to the absorbance values determined before and after the extraction with N-hexadecane, respectively (Santos et al., 2015).

2.3.4 Autoaggregation and coaggregation with *L. monocytogenes* and *E. coli*

For the evaluation of autoaggregation capacity, *Lactobacillus* strains grown anaerobically in MRS broth (20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) were harvested by centrifugation (7,000 g × 10 min, 20 °C), washed, resuspended and diluted in saline solution (NaCl 0.85 g/100mL) to achieve an OD at 660nm (OD_{660nm}) of 0.3. After a 60 min-incubation at 37 °C, the OD_{660nm} value was measured again. The autoaggregation was determined using the equation: % autoaggregation = [(OD₀–OD₆₀)/OD₀] × 100; where OD₀ refers to the initial OD value and OD₆₀ refer to the OD value determined after the 60 min-incubation (Todorov et al., 2008).

For the evaluation of coaggregation capacity, the *Lactobacillus* strains were similarly grown in MRS broth, harvested by centrifugation (7,000 g × 10 min, 20 °C), washed, resuspended and diluted in saline solution (NaCl 0.85 g/100mL) to achieve an OD_{660nm} value of 0.3. A 750 µL-aliquot of each *Lactobacillus* suspension was mixed with the same volume of a suspension of the coaggregation partner *L. monocytogenes* (INCQS 00266, origin ATCC 7644) or *E. coli* (INCQS 00219, origin ATCC 8739) and vortexed for 30 s. The OD_{660nm} value was determined on time zero (baseline - just after mixing the suspensions) and after 60 min incubation at 37 °C. Coaggregation was measured using the equation: % coaggregation = [(OD₀–OD₆₀)/OD₀] × 100; where OD₀ refers to the initial OD value determined at time zero and OD₆₀ refers to the OD value of the supernatant after the 60 min-incubation (Todorov et al., 2008).

2.3.5 Antagonistic activity against pathogens

The antagonistic activity of each *Lactobacillus* strain against the indicator bacterial strains as well as the other examined *Lactobacillus* strains was evaluated using spot agar and well diffusion tests. For the spot agar test, a 10 μ L-aliquot of each *Lactobacillus* strain grown anaerobically in MRS broth (20 – 24 °C, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) was spotted on the surface of MRS agar containing 0.2% (w/v) glucose and 1.2% (w/v) bacteriological agar (HiMedia, Mumbai, India) and incubated anaerobically for 24 h at 37 °C. A 1 mL-aliquot of each indicator bacterium was mixed with 18 mL-soft BHI agar (with 0.7% agar) and poured over the spot-inoculated MRS agar. The plates were incubated aerobically at 37 °C for 48 h. The antagonistic activity was recorded as the diameter (mm) of growth inhibition zones around each spot (Jacobsen et al., 1999). Non-inoculated MRS agar was used as a negative control.

For the well diffusion test, the *Lactobacillus* strains were similarly cultivated in MRS broth and the cell free culture supernatants were collected by centrifugation (15,000 $g \times 15$ min, 4 °C). A 1 mL-aliquot of each indicator bacterium was incorporated into 20 mL-BHI soft agar plates, and 50 μ L-aliquots of the *Lactobacillus* cell free culture supernatants were added into wells (5 mm diameter and 5 mm depth) in BHI agar. The plates were aerobically incubated at 37 °C for 48 h. The antagonistic activity was recorded as the diameter (mm) of growth inhibition zones around each well. In this assay, non-inoculated MRS broth was used as a negative control (Vitali et al., 2012).

In both spot agar and well diffusion tests the appearance of inhibition zone with diameter greater than 1 mm (around the spot or well) was considered as positive antagonistic activity (Jacobsen et al., 1999).

2.3.6 Exposure to simulated gastrointestinal conditions

Lactobacillus strains grown anaerobically in MRS broth (20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) were exposed to simulated gastrointestinal conditions in MRS broth, whole milk (Cemil, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil) and whole grape juice (Aurora, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Brazil). These assays were carried out to observe the survival rates of the examined strains throughout the exposure to the simulated gastrointestinal conditions as well as to observe if the tested matrices are capable of exerting some protective effects on the examined strains under these conditions. Initially, 25 mL-aliquots of MRS broth, milk or grape juice were put in glass

flasks (50 mL) and inoculated with the examined strains (initial viable count 6 – 7 log cfu/mL). The simulation in these flasks was performed continuously in phases mimicking mastication and conditions in esophagus-stomach, duodenum and ileum. The mechanical agitation was used to simulate the peristaltic movements and the test was performed in incubator at 37 °C with rotation adjustment in each phase. The mastication was simulated using 100 U α -amylase diluted in 1 mL of 1 mM CaCl₂ mL, pH adjusted to 6.9 with 1 M NaHCO₃ and exposure time of 2 min at 200 rpm; esophagus-stomach conditions with 25 mg of pepsin diluted in 1 mL of 0.1 M HCl, added at a rate of 0.05 mL/mL, pH with gradual decrease using 1 M HCl (pH 5.5/10 min; pH 4.6/10 min; pH 3.8/10 min; pH 2.8/20 min; pH 2.3/20 min and pH 2/20 min) under stirring (130 rpm). Duodenal conditions were simulated with 2 g pancreatin/L of 0.1M NaHCO₃ and 12 g bovine bile salts/L of 0.1M NaHCO₃, pH adjusted for 5 with 0.1 M NaHCO₃ and exposure time of 30 min under stirring (45 rpm); and ileal conditions were simulated with pH adjusted to 6.5 using 0.1 M NaHCO₃, exposure time of 60 min under stirring (45 rpm). All the enzymes and bovine bile salts were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). After each simulated gastrointestinal condition, 100 μ L-aliquots of the MRS broth, milk and grape juice were serially diluted in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) and plated on MRS agar (HiMedia, Mumbai, India) (Meira et al., 2015). After an incubation period of 48 h at 37 °C under anaerobiosis, the viable cells were counted and the results were expressed as log cfu/mL. Inoculated MRS broth, grape juice and milk samples maintained at 37 °C without exposure to the gastrointestinal simulation conditions were used as controls. A detection limit of 1 log cfu/mL was used in these assays.

2.4 Technological properties

2.4.1 Proteolytic and lipolytic activity

For evaluation of proteolytic activity, a 10 μ L-aliquot of each *Lactobacillus* strain grown anaerobically in MRS broth (20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) was streaked onto plate count agar (HiMedia, Mumbai, India) supplemented with 10% (w/v) sterilized (121 °C for 15 min, 1 atm) skim milk (Camponesa, Minas Gerais, Brazil) and incubated anaerobically at 30 °C for 72 h. The appearance of a clear zone surrounding the colonies was considered positive for proteolytic activity (Franciosi et al., 2009; Domingos-Lopes et al., 2017). The lipolytic activity was evaluated by streaking a 10- μ L aliquot of each *Lactobacillus* strain onto dried surface of Tributyrin agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and incubating anaerobically at 30 °C for 72 h. The appearance of a

clear zone surrounding the colonies was considered positive for lipolytic activity (Domingos-Lopes et al., 2017; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007).

2.4.2 Tolerance to NaCl

The cultures of the tested *Lactobacillus* strains grown anaerobically in MRS broth (20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) were transferred (3%, v/v) for a fresh MRS broth supplemented with 1, 2, 3, 4 or 5% (w/v) NaCl and for a fresh MRS broth not-supplemented with NaCl (control) and incubated anaerobically at 37 °C. The viable counts in MRS broth with and without NaCl were enumerated after 24 h-incubation. The results were expressed as percent survival rates, i.e. the difference between the viable counts enumerated in MRS broth with the tested NaCl concentration with that observed in MRS without NaCl (control) (Das et al., 2016). A detection limit of 1 log cfu/mL was used in these assays.

2.4.4 Exopolysaccharide (EPS) production

The *Lactobacillus* strains were cultured in MRS broth supplemented with 2% (w/v) glucose for 3 days at 37 °C under anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK). The cells were centrifuged (6,000 g × 20 min, 20 °C), mixed in a rate of 1:2 with 95% (v/v) cold ethanol (Fmaia, Minas Gerais, Brazil) and maintained at 4 °C for 24 h to induce the EPS precipitation. EPS precipitates were recovered by centrifugation (2,000 g × 15 min, 4 °C), washed with distilled water and dried at 55 °C until constant weight. The dry weight (mg/L) was measured to determine the amount of EPS produced (Almeida Júnior, 2015; Van Geel-Schütten et al., 1998).

2.4.5 Diacetyl production

The cells of the *Lactobacillus* strains grown anaerobically in MRS broth (20 – 24 h, 37 °C, using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) were collected by centrifugation (4,000 g × 15 min, 4 °C), washed and resuspended in saline solution (NaCl 0.85 g/100mL) and added (100 µL) into 10 mL-UHT whole milk (Cemil, Patos de Minas, Brazil). After a 24 h-incubation at 37 °C, 0.5 mL of 1% (w/v) α -naphthol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 16% (w/v) KOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were mixed with a 1 mL-aliquot of the bacterial culture in UHT-whole milk and incubated for 10 min at 37 °C. The formation of a red ring at the top of the mixtures was considered positive for diacetyl production (King, 1948; Almeida Júnior et al., 2015). The strains were classified as weak (+),

medium (++) and strong (+++) diacetyl producers considering the intensity of the formed red ring.

2.5 Reproducibility and statistical analysis

All assays were performed in triplicate in three independent experiments, and the results expressed as the average of the obtained data. Statistical analyses were performed to determine significant differences ($P \leq 0.05$) among obtained results using the ANOVA followed by Tukey's. These analyses were performed using the software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, California).

3. Results

3.1 Safety properties

The MIC of different antibiotics against the tested *Lactobacillus* strains is shown in Table 1. All strains were resistant to erythromycin. One strain was resistant to clindamycin (*L. fermentum* 60) and two were resistant to tetracycline (*L. plantarum* 53 and *L. fermentum* 60). Only one strain did not show resistance to kanamycin (*L. fermentum* 296) and two strains did not show resistance to gentamycin (*L. fermentum* 263 and *L. fermentum* 296). None of the strains was resistant to ampicillin and chloramphenicol.

None of the examined *Lactobacillus* strains were capable of degrading mucin or developing total or partial β - or α -hemolysis (data not shown).

3.2 Physiological functionality properties

Lactobacillus strains showed sharp decreases in viable counts when they were exposed to pH 2 or 3 for 2 or 3 h (Table 2). *L. fermentum* 296 presented the highest counts following the 2 h-exposure to pH 2 and the 3 h-exposure to pH 3. At pH 5, only *L. paracasei* 106 and *L. fermentum* 139 showed viable counts <1 log cfu/mL after 2 and 3 h-exposure, respectively; the other examined strains presented viable counts similar to those observed to the control. Only *L. fermentum* 141 showed viable counts of <1 cfu/log /mL following the 1, 2 or 3 h-exposure to 0.15, 0.3 and 1% bile salts; the same behavior was observed for *L. fermentum* 56 when exposed to 1% bile salts. The other examined strains presented viable counts in the range of 4.2 – 7.5 log cfu/mL when exposed to 0.15, 0.3 and 1% bile salts over the monitored exposure time intervals. Overall, there was no clear influence of the exposure time and the effects of different bile salts concentrations on the *Lactobacillus* viable counts (Table 2).

None of the tested *Lactobacillus* strains showed ability to deconjugate taurocholic and glycocholic acid salts. Furthermore, glycocholic acid totally inhibited the growth of all examined strains and taurocholic acid displayed a slight reduction of the growth of most strains (data not shown). The tested *Lactobacillus* strains showed results of surface hydrophobicity in the range of 6.7 – 43.5%. Five strains displayed surface hydrophobicity values varying from 10 to 20%; the highest and lowest surface hydrophobicity values were observed for *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 296, respectively (Table 3).

All the examined *Lactobacillus* strains presented ability to autoaggregate and coaggregate (Table 3). The values for autoaggregation were in the range of 13.6 – 48.4%. The highest values for autoaggregation were displayed by *L. paracasei* 106, *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 60 and *L. fermentum* 296. The values for coaggregation with *L. monocytogenes* and *E. coli* were in the range of 10.2 – 51.8 and 2.4 – 41.3%, respectively. In most cases, the examined *Lactobacillus* strains presented higher ability to coaggregate with *L. monocytogenes* than with *E. coli*.

The nine examined *Lactobacillus* strains presented inhibitory effects against *S. Typhimurium* INCQS 00150, *S. Enteritidis* INCQS 00258, *L. monocytogenes* INCQS 00266 and *E. coli* INCQS 00219 in both well diffusion and spot agar assays (Table 4). Only *L. paracasei* 106 did not inhibit *S. aureus* INCQS 00015 in spot agar assay. The cell free culture supernatants of *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 141, *L. fermentum* 250 and *L. fermentum* 296 did not inhibit *S. aureus* INCQS 00015. Overall, the diameters of the growth inhibition zones were greater in spot agar than in well diffusion assays. The strongest antagonistic activities in spot agar and well diffusion assays were showed by *L. plantarum* 53 and *L. fermentum* 60. None of the tested *Lactobacillus* strains were able to inhibit each other (data not shown).

When viable counts of the *Lactobacillus* strains in MRS broth, grape juice and milk during the exposure to simulated digestion conditions were evaluated (data in supplementary material) it was noted that the exposure to the 1st phase of the simulated digestion (mouth conditions, pH 6.9, exposure time 2 min) did not decrease ($P > 0.05$) the counts of the examined strains in MRS both, grape juice and milk. The exposure to the 4th digestive phase (stomach conditions, pH 3.8, exposure time 32 min) in grape juice caused decreases of ≥ 3 log units in viable counts of *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 141 and *L. fermentum* 263; the decrease in counts of the other strains varied of 1.7 – 2.6 log units under this condition. The exposure of all examined strains up to the 5th (stomach condition, pH 2.8, exposure time 52 min) and 6th digestive phase (stomach condition, pH 2.3, exposure time 72 min) in milk caused counts decreases in the range of 0.3 – 1.8 log units.

The viable counts of the tested strains were in the range of $<1 - 4.2$ log cfu/mL when they were exposed to the 5th and 6th digestive phases in grape juice. The counts of *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 141 and *L. fermentum* 263 when exposed to the 7th digestive phase (stomach condition, pH 2, exposure time 92 min) in milk were in the range of 4.6 – 4.9 log cfu/mL. The exposure to the 8th (duodenum condition, pH 5, exposure time 122 min) and 9th digestive phase (ileal conditions, pH 6.5, exposure time 182 min) did not result in further reductions ($P > 0.05$) in counts of all tested strains in milk. *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 141 and *L. fermentum* 263 showed counts of <1 log cfu/mL when exposed to the 7th, 8th and 9th digestive phases in grape juice.

At the end of the exposure to the digestive conditions (following simulated ileal conditions), the counts of *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 56, *L. fermentum* 60, *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 250 and *L. fermentum* 296 in milk were ≤ 1 log unit lower than those observed in MRS broth (control; 5.7 – 7.0 log cfu/mL), and the highest counts (5.9 – 6.6 log cfu/mL) were observed for *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 60 and *L. fermentum* 250. The strains *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 141 and *L. fermentum* 263 were the most sensitive to the exposure to simulated digestion in both milk and grape juice. The highest decreases in counts of the tested strains were observed in grape juice. Viable counts of the examined *Lactobacillus* strains in grape juice, milk and MRS broth not exposed to the simulated gastrointestinal conditions were in the range of 5.9 – 7.3 log cfu/mL during the 182 min-exposure (data not shown).

3.3 Technological properties

All the examined *Lactobacillus* strains were positive for proteolytic activity and none of them was positive for lipolytic activity (data not shown). All the strains were capable of producing EPS, with amounts in the range of 43.4 – 58.2 mg/L (Table 3). The production of EPS in amounts >50 mg/L were displayed by *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 263 and *L. fermentum* 296. Similarly, all the strains were capable of producing diacetyl; five strains could be classified as medium (*L. fermentum* 60, *L. fermentum* 141 and *L. fermentum* 250) or strong (*L. paracasei* 106 and *L. fermentum* 139) diacetyl producers (Table 3).

The results of NaCl tolerance are shown in Table 5. The tested *Lactobacillus* strains presented good tolerance to 1% NaCl with survival rates in the range of 81.1 – 95.4%. Only *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 60 and *L. paracasei* 106 presented survival rates $\leq 16.6\%$ when exposed to 2% NaCl; the other strains presented survival rates $\geq 83.8\%$ under these conditions. Similarly, *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 60 and *L. paracasei* 106 presented the lowest

survival rates when exposed to 3 and 4% NaCl (≤ 7.7 and 7.1%, respectively); for the other strains, the survival rates were in the range of 29.4 - 59.6% under these conditions. Only four strains presented survival rates $<10\%$ when exposed to 5% NaCl; the survival rates for the other strains were in the range of 11.3– 16.0%. Overall, *L. fermentum* 141, *L. fermentum* 250 and *L. fermentum* 263 presented the highest tolerance to all NaCl concentrations tested.

4. Discussion

The European Food Safety Authority considers that bacterial strains carrying antibiotic resistance related to acquired genetic determinants have high potential for horizontal spread and should not be incorporated into foods; otherwise, considers that bacterial strains carrying intrinsic or chromosomal mutation antibiotic resistance have a minimal to low potential for horizontal resistance spread and generally may be incorporated into foods (EFSA, 2012). Most of the *Lactobacillus* strains tested in this study were resistant to gentamycin and kanamycin when compared to EFSA cut off values. The resistance to aminoglycoside antibiotics (such as gentamycin and kanamycin) has been recognized as intrinsic in *Lactobacillus* genus (Argyri et al., 2013; Danielsen and Wind, 2003; Monteagudo-Mera et al., 2012). All the examined *Lactobacillus* strains were resistant to erythromycin. The erythromycin resistance in *Lactobacillus* has been associated with an only mutation in 23S rRNA gene (Gueimonde et al., 2013). Particularly, the resistance to tetracycline observed in *L. plantarum* 53 e *L. fermentum* 60 must be carefully considered. Controversially, some studies have described the tetracycline resistance genes *tet(M)*, *tet(L)*, *tet(K)* and *tet(S)* as being chromosomic in LAB (Gueimonde et al., 2013; Zonenschain et al., 2009; Shao et al., 2015) while others have shown the *tet(M)* as being localized in plasmids (Danielsen, 2002; Gevers et al., 2003), which are commonly able to move among bacteria.

Indistinctly, none of the tested *Lactobacillus* strains were capable of causing hemolysis and degrading the mucin. The absence of hemolytic activity and ability to degrade mucin are recommended safety prerequisites for probiotics (Abe et al., 2010; Zhou et al., 2001). Hemolysins are toxins that cause the lysis of the erythrocytes (Husain, 2008). *Lactobacillus* species are typically non-hemolytic, although some studies have found partial hemolytic activity in some *Lactobacillus* strains (Lee et al., 2011a; Marroki and Bousmaha-Marroki, 2014). The inability of the *Lactobacillus* strains to degrade mucin is an important characteristic since the production of mucin-degrading enzymes is cited as a virulence factor in enteropathogens (Monteagudo-Mera et al., 2012) and, consequently, a non-desirable feature in probiotics (Zhou et al., 2001). The presence of mucin covering the intestinal

epithelial cells plays an important role preventing the translocation and mucosal penetration by pathogens and other toxic agents (Abe et al., 2010; Zhou et al., 2001).

In addition to not degrading the mucin, the prevention of pathogen adhesion to intestinal cells by probiotics has been related to their cell surface hydrophobicity (determined as adhesion to N-hexadecane) (Santos et al., 2015). The average values of cell surface hydrophobicity for the *Lactobacillus* strains tested in this study revealed weak to moderate surface hydrophobicity. In agreement with our results, variability in cell surface hydrophobicity among *Lactobacillus* species and even among strains of the same species has been observed (Das et al., 2016; Sagdic et al., 2014). Although microbial adhesion to N-hexadecane is considered a valid tool to estimate the bacterial capability to adhere to epithelial cells, *Lactobacillus* strains with low hydrophobicity may present high adhesion level to HT-29 cells, considered the gold standard for *in vitro* evaluation of microbial adhesion (Das et al., 2016; Lee et al., 2011b; Todorov et al., 2008). These findings suggest that the microbial adhesion to host tissue involves other mechanisms behind the hydrophobicity of the cell surface (Ross and Jonsson, 2002; Santos et al., 2015).

The low cell surface hydrophobicity of the tested *Lactobacillus* strains did not impact negatively their autoaggregation properties. The examined strains displayed high rates of autoaggregation considering the short contact time of 60 min (Angmo et al., 2016). The autoaggregation rates of *Lactobacillus* commonly increase with the contact time duration (Dias et al., 2013; Goh and Klaenhammer, 2010). Considering the results of autoaggregation assays, *L. paracasei* 106, *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 60 and *L. fermentum* 296 could hypothetically produce the highest barrier effects to prevent the colonization of pathogens, in addition to better compete for the host binding sites (Ferreira et al., 2011). High aggregation rates facilitate the persistence of beneficial organisms in the gastrointestinal tract and the induction of their beneficial effects in the host (Santos et al., 2015). The coaggregation is an important property in *Lactobacillus* indicating their potential ability to prevent the colonization of pathogens and to compete with them through antagonistic interactions (Argyri et al., 2013; Vijayakumar et al., 2015). Overall, the highest coaggregation values were observed with *L. monocytogenes*, suggesting a better ability of the examined *Lactobacillus* strains to bind to Gram-positive organisms than to *E. coli*, as a Gram-negative organism (Tuo et al., 2013; Santos et al., 2015).

Eight of the nine examined *Lactobacillus* strains presented capability of inhibiting *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Samonella* Typhimurium and *S. aureus* in sport agar and/or well diffusion test, although the nature of the inhibitory substances remains

unknown. The efficacy of lactobacilli to inhibit pathogenic bacteria is one of the most important functional properties of probiotics (Argyri et al., 2013; Monteagudo-Mera et al., 2012) and directly related to their capability of producing antimicrobial compounds (Garcia et al., 2016; Oliveira et al., 2008). The production of antimicrobial compounds by *Lactobacillus* occurs naturally during fermentation, considered to be of technological importance for food preservation (Xue et al., 2015).

The adhesion of probiotics to intestinal mucosa has been also associated with their ability to produce EPS (Ruas-Madiedo et al., 2007). Typically, the production of EPS by *Lactobacillus* strains is in the range of 10 - 100 mg/L (Almeida Júnior et al., 2015; Anandharaj et al., 2015). EPS production in the range of 43 – 58 mg/mL was seen in this study. The EPS structure may promote interactions between probiotics and host specific receptors (García-Ruiz et al., 2014) and act as a capsule or slime bound to the cells surface protecting against toxic agents and stressing conditions encountered during the gastrointestinal tract passage (Lindström et al., 2012) or imposed by food preservation technologies (Stack et al., 2010). Additionally, increasing attention has been given to the EPS production by probiotic *Lactobacillus* because of its possible immunogenic properties in the host (Domingos-Lopes et al., 2017; Patel et al., 2010).

Since probiotics should survive in the stomach where gastric juice (pH 2 – 3) is present, the tolerance to acidic pH is an important selection criterion for probiotics. Normally, this low pH causes sharp decreases in bacterial counts (Singh et al., 2012). *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 56, *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 250, *L. fermentum* 263 and *L. fermentum* 296 survived after 1 h-exposure to pH 2, but only *L. fermentum* 296 survived after 2 and 3 h-exposure to this condition. The exposure to pH 3 for 1 h did not cause sharp reduction in viable counts of any of the tested strains, but only two strains (*L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 141) and one strain (*L. fermentum* 296) survived after 2 and 3 h-exposure to this condition, respectively. *L. casei* 139 and *L. fermentum* 141 were the least tolerant strains to the low pH. Studies have shown that the capability of different *Lactobacillus* strains to survive to acid conditions is variable (Garcia et al., 2016; Jacobsen et al., 1999; Monteagudo-Mera et al., 2012). The examined strains presented good tolerance to 0.15, 0.3 and 1% bile salts over the 3-h exposure time, with the exception of *L. fermentum* 141 that did not survive to any of these conditions. Bile tolerance is an important feature in *Lactobacillus* species enabling them to survive during the gastrointestinal transit (Garcia et al., 2016).

In the stomach, probiotics are not necessarily challenged with pH value as low as 2 and 3 because the gastric environment may be buffered by food components (Zárate et al., 2000).

Components of food matrices may also confer direct protective effects on bacterial cells (Garcia et al., 2016). Thus, the survival rates of the tested *Lactobacillus* strains when exposed to simulated gastrointestinal conditions in a laboratorial media (MRS broth) as well as in a dairy (whole milk) and vegetal matrix (grape juice) were monitored. The exposure to the 4th digestive phase (stomach conditions, pH 3.8, exposure time 32 min) in grape juice caused sharp decreases in viable counts of all examined strains, and *L. paracasei* 106, *L. fermentum* 141 and *L. fermentum* 263 presented the highest viable count reductions. Additional decreases in viable counts of the examined strains were observed following the exposure to the 5th (stomach conditions, pH 2.8, exposure time 52 min) and 6th digestive (stomach conditions, pH 2.3, exposure time 72 min) phases in grape juice, and no survivors were detected for some of the examined *Lactobacillus* strains following the exposure to the 7th (stomach conditions, pH 2, exposure time 92 min), 8th (duodenum conditions, pH 5, exposure time 122 min) and 9th (ileal conditions, pH 6.5, exposure time 182 min) digestive phases. The exposure to the different phases forming the simulated digestion in milk caused lower impacts on the viable counts of the examined strains compared to grape juice. The high acidity of grape juice and the presence of antimicrobial compounds (e.g., phenolics) may have enhanced the inhibitory effects imposed by the acidic conditions and the presence of enzymes and/or bile salts in cultivation media on the tested *Lactobacillus* strains (Nualkaekul and Charalampopoulos, 2011; Nualkaekul et al., 2012). Overall, *L. plantarum* 53, *L. fermentum* 60 and *L. fermentum* 250 presented the best survival performances during the exposure to the simulated digestion in both milk and grape juice.

The bile salt tolerance in probiotics was initially related to the bile salt hydrolase activity (Corzo and Gilliland, 1999; Solieri et al., 2014). The good tolerance to bile salts among the examined *Lactobacillus* strains was not associated with their capacity to deconjugate taurocholic and glycocholic acid salts, which is in agreement with the findings of previous investigations with potentially probiotic *Lactobacillus* species (Argyri et al., 2013; Mathara et al., 2008; Vinderola and Reinheimer, 2003). These reports suggest that the capability of causing bile salts deconjugation in lactobacilli is not related to their capacity to tolerate the conjugated bile salts. The results of this study also showed that all examined *Lactobacillus* strains were capable of surviving in the presence of tauroconjugated bile salts, in opposite to the total growth inhibition in the presence of glycoconjugated bile salts. These findings are interesting because other mechanisms alternative to bile salts hydrolase may be involved in the role of probiotics to counteract the bile damages (Solieri et al., 2014). Considering that the toxicity of glycoconjugated bile salts was higher than that observed to

tauroconjugated bile salts, the bile salts hydrolase activity displayed by the examined *Lactobacillus* strains could be important to counteract the toxic effects of tauroconjugated bile salts rather than of glycoconjugated bile salts (Begley et al., 2006; Solieri et al., 2014).

The ability of microorganisms to exert extracellular proteolytic and lipolytic activities is an important technological characteristic to develop particular sensory characteristics of texture and flavour in fermented foods. All the examined *Lactobacillus* strains showed proteolytic activity, but none of them showed lipolytic activity. Probiotic lactobacilli have shown good proteolytic activity resulting in higher levels of soluble proteins and delivery of free amino acids in food matrices (Bezerra et al., 2016). The absence of lipolytic activity in *Lactobacillus* strains verified in this study is in agreement with the available literature showing that *Lactobacillus* strains typically present absence or weak lipolytic activity (Domingos-Lopes et al., 2017; Landeta et al., 2013).

The examined *Lactobacillus* strains presented the ability to produce diacetyl, and five of them were characterized as medium- (*L. fermentum* 60, *L. fermentum* 141 and *L. fermentum* 250) or high-level (*L. paracasei* 106, *L. fermentum* 139) diacetyl producers. Diacetyl is a volatile compound derived from citrate metabolism with important role for the development of distinct characteristics in fermented products, primarily in dairy products (Rincon-Delgadillo et al., 2012). The ability of *Lactobacillus* strains intended for inclusion into food matrices to tolerate NaCl concentrations is an important feature because the NaCl concentrations commonly used in foods can be inhibitory to these microorganisms (Gregoret et al., 2013). Overall, the examined *Lactobacillus* strains presented high tolerance to 1 and 2% NaCl. *Lactobacillus* species typically present good tolerance to 2 - 3% NaCl, and concentrations $\geq 4\%$ NaCl commonly cause sharp decrease in their survival rates (Ilha et al., 2015; Reale et al., 2015). Although 4 and 5% NaCl caused sharp reductions in viable counts of most of the examined *Lactobacillus* strains, survivors of all strains were detected at 4 and 5% NaCl, in opposite to an early report that observed no survivors of *Lactobacillus* strains at 3% NaCl (Rivas et al., 2012).

In conclusion, the results of this study indicate that the examined *Lactobacillus* strains present physiological functionalities of adhesion, aggregation, coaggregation, antagonism and survival to the exposure to simulated gastrointestinal conditions, in addition to not present hemolytic and mucinolytic activities. The potentially transferable resistance to tetracycline showed by two (*L. plantarum* 53 and *L. fermentum* 60) of the nine examined strains warrants further studies on the nature of this resistance before any of these strains can be considered safe for human use. Particularly, the examined strains presented ability to survive to simulated

gastrointestinal conditions in milk rather than in grape juice. These strains also presented technological properties, as assessed by NaCl tolerance, proteolytic activity, EPS and diacetyl production, which may direct their incorporation into selected foods. Overall, the strains *L. fermentum* 139, *L. fermentum* 263 and *L. fermentum* 296 showed the best performance for most of the evaluated properties. Therefore, these results indicate that wild *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts could be candidates for use as probiotics and enable the development of probiotic foods with distinct characteristics because of their technological characteristics.

Acknowledgments

The authors are grateful to CNPq (Brazil) and CAPES for the financial support (Science without Borders Program – Call Special Visiting Research - Grant 400384/2013-2). The authors are specifically grateful to CAPES for the fellowship granted for the first author T.M.R. de Albuquerque.

References

- Abe, F., Muto, M., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Aihara, H., Ohashi, Y., Fujisawa, T., 2010. Safety evaluation of probiotic bifidobacteria by analysis of mucin degradation activity and translocation ability. *Anaerobe* 16, 131-136.
- Almeida Júnior, W. L. G., Ferrari, I. S., Souza, J. V., Silva, C. D. A., Costa, M. M., Dias, F. S., 2015. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Cont.* 53, 96-103.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B., Santhanakaruppu, R., Manimaran, M., Rani, R. P., Sivakumar, S., 2015. Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Res. Microbiol.* 166, 428-439.
- Andrade, R. A. M. S., Maciel, M. I. S., Santos, A. M. P., Melo, E. A., 2015. Optimization of the extraction process of polyphenols from cashew apple agro-industrial residues. *Food Sci. Technol.* 35, 354-360.
- Angmo, K., Kumari, A., Savitri, Bhalla, T. C., 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *Food Sci. Technol.* 66, 428–435.

- Argyri, A. A. Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A., Tsakalidou, E., Nychas, G. J., Panagou, E. Z., Tassou, C. C., 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* 33, 282–291.
- Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J. A., Siddiqui, M. W., Dávila-Aviña, J. E., González-Aguilar, G.A., 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Res. Int.* 44, 1866–1874.
- Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G., 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1729-1738.
- Bezerra, T. K. A., Araújo, A. R. R., Nascimento, E. S., Paz, J. E. M., Gadelha, C. A., Gadelha, T. S., Pacheco, M. T. B., Queiroga, R. C. R. E., Oliveira, M. E. G., Madruga, M. S., 2016. Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. *Food Chem.* 196, 359–366.
- Corzo, G., Gilliland, S. E., 1999. Bile salt hydrolase activity of three strain of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 82, 472-480.
- Danielsen, M., 2002. Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Plasmid* 48, 98-103.
- Danielsen, M., Wind, A., 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 1–11.
- Das, P., Khowala, S., Biswas, S., 2016. *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. *Food Sci. Technol.* 73, 383-390.
- Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C.G., Ricciuti, P., Gobbetti, M., 2010. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L.Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiol.* 27, 381–389.
- Dias, F. S., Duarte, W. F., Schwan, R. F., 2013. Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Biosci. J.* 29, 1678–1686.
- Dias, M., Miguel, M. G. C., Duarte, W. F., Silva, C. F., Schwan, R. F. 2014. Epiphytic bacteria biodiversity in Brazilian cerrado fruit and their cellulolytic activity potential. *Ann Microbiol.* 65, 851-864.
- Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L. E., Silva, C. C. G., 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiol.* 63, 178-190.

- Duarte, F. N. D., Rodrigues, J. B., Lima, M. C., Lima, M. S., Pacheco, M. T. B., Pintado, M. M. E., Aquino, J. S., de Souza, E. L., 2017. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. J. Sci. Food in press.
- EFSA. 2012. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA J. 10, 1-10.
- FAO/WHO, 2006. Probiotics in food-health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 85, Rome.
- Ferreira, C. L., Grześkowiak, L., Collado, M. C., Salminen, S., 2011. *In vitro* evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens. J. Food Prot. 74, 1482–1487.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., Poznanski, E., 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. Int. Dairy J. 19, 3-11.
- Garcia, E. F. Luciano, W. A., Xavier, D. E., Costa, W. C. A., Oliveira, K. S., Franco, O. L. Morais Júnior, M. A., Lucena, B. T. L., Picão, R. C., Magnani, M., Saarela, M., de Souza, E. L., 2016. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing by products and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. Front. Microbiol. 7, 1-11.
- García-Ruiz, A., Llano, D. G., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolome, B., Moreno-Arribas, M. V., 2014. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. Food Microbiol. 44, 220-225.
- Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J., Stackebrandt, E., de Peer, I.V., Vandamme, P., Thompson F.L., Swings, J., 2005. Re-evaluating prokaryotic species. Nat. Rev. Microbiol. 3, 733-739.
- Goh, Y. J., Klaenhammer, T. R., 2010. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5005–5012.
- Gregoret, V., Perezlindo, M. J., Vinderola, G., Reinheimer, J., Binetti, A., 2013. A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. Food Microbiol. 34, 19–28.
- Gueimonde, M., Sánchez, B.G., Reyes-Gavilán, C. L., Margolles, A., 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. Front. Microbiol. 4, 1-6.

- Hantsis-Zacharov, E., Halpern, M., 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7162-7168.
- Husain, S., 2008. Effect of ferric iron on siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29 L. *Curr. Microbiol.* 57, 331–334.
- Ilha, E. C., da Silva, T., Lorenz, J. G., Rocha, G. O., Sant’Anna, E. S., 2015. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *Eur. Food Res. Technol.* 240, 977–984.
- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Møller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., Jakobsen, 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4949–4956.
- King, N., 1948. Modification of Voguesse Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetyl methyl carbinol plus diacetyl in butter. *Dairy Ind.* 13, 860-866.
- Landeta, G., Curiel, J. A., Carrascosa, A. V., Muñoz, R., Rivas, B., 2013. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Sci.* 95, 272–280.
- Lee, J., Yun, H. S., Cho, K. W., Oh, S., Kim, S. H., Chun, T., Kim, B., Whang, K. Y., 2011a. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immune modulation and longevity. *Int. J. Food Microbiol.* 148, 80–86.
- Lee, H., Yoon, H., Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, J., Shin, H., Holzapfel, W., 2011b. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 155-161.
- Lindström, C., Holst, O., Nilsson, L., Öste, R., Andersson, K.E., 2012. Effects of *Pediococcus parvulus* 2.6 and its exopolysaccharide on plasma cholesterol levels and inflammatory markers in mice. *AMB Express* 2, 2-9.
- Marroki, A., Bousmaha-Marroki, L., 2014. Lactobacilli isolated from Algerian goat’s milk as adjunct culture in dairy products. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 57, 410-420.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Guigas, C., Franz, C., Holzapfel, W. H., 2008. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Curr. Microbiol.* 56, 315-321.
- Meira, Q. G. S., Magnani, M., Medeiros Júnior, F. C., Queiroga, R. C. R. E., Madruga, M. S., Gullón, B., Gomes, A. M. P., Pintado, M. M. E., de Souza, E. L., 2015. Effects of added

- Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. *Food Res. Int.* 76, 828–838.
- Monteagudo-Mera, A., Rodriguez-Aparicio, L., Rua, J., Martinez-Blanco, H., Navasa, N., Garcia-Armesto, R.M., Ferrero, M.A., 2012. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J. Funct. Foods* 4, 531-541.
- Naeem, M., Ilyas, M., Haider, S., Baig, S., Saleem, M., 2012. Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. *Pak. J. Bot.* 44, 323–328.
- Nematollahi, A., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., Jazaeri, S., 2016. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. *Electron. J. Biotechnol.* 21, 49–53.
- Nualkaekul, S., Charalampopoulos, D., 2011. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 111–117.
- Nualkaekul, S., Deepika, G., Charalampopoulos, D., 2012. Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. *Food Res. Int.* 48, 627–633.
- Oh, Y.J., Jung, D.S., 2015. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. *Food Sci. Technol.*, 63, 437–444.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I. C. F. R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J. A., 2008. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2326–2331.
- Patel, A. K., Michaud, P., Singhania, R. R., Soccol, C. R., Pandey, A., 2010. Polysaccharides from probiotics: new developments as food additives. *Food Technol. Biotech.* 48, 451-463.
- Reale, A., Di Renzo, T., Rossi, F., Zotta, T., Iacumin, L., Preziuso, M., Parente, E., Sorrentino, E., Coppola, R., 2015. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *Food Sci. Technol.* 60, 721-728.
- Rincon-Delgado, M. I., Lopez-Hernandez, A., Wijaya, I., Rankin, S. A., 2012. Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. *J. Dairy Sci.* 95, 1128-1139.

- Rivas, F. P., Castro, M. P., Vallejo, M., Marguet, E., Campos, C. A., 2012. Antibacterial potential of *E. faecium* strains from ewes' milk and cheese. *Food Sci. Technol.* 46, 428-436.
- Ross, S., Jonsson, H., 2002. A high-molecular mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology* 148, 433–442.
- Ruas-Madiedo, P., Moreno, J. A., Salazar, N., Delgado, S., Mayo, B., Margolles, A., Reyes-Gavilán, C. G., 2007. Screening of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4385-4388.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T., 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84, 197-215.
- Sagdic, O., Ozturk, I., Yapar, N., Yetim, H., 2014. Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberry bush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. *Food Res. Int.* 64, 537-545.
- Salvucci, E., Leblanc, J. G, Pérez, G., 2016. Technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *Food Sci. Technol.* 70, 185-191.
- Sancho, S. O., Silva, A. R. A., Dantas, A. N. S., Magalhães, T. A., Lopes, G. S., Rodrigues, S., Costa, J. M. C., Fernandes, F. A. N., Silva, M. G. V., 2015. Characterization of the industrial residues of seven fruits and prospection of their potential application as food supplements. *J. Chem.* 2015, 1-8.
- Santos, K. M. O., Vieira, A. D. S., Rocha, C. R. C., Nascimento, J. C. F., Lopes, A. C. S., Bruno, L. M., Carvalho, J. D. G., Franco, B. D. G. M., Todorov, S. D., 2014. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: Characterization of the bacteriocinogenic potential. *Ann. Microbiol.* 64, 1463-1471.
- Santos, K. M. O., Vieira, A. D. S., Buriti, F. C. A., Nascimento, J. C. F., Melo, M. E. S., Bruno, L. M., Borges, M. F., Rocha, C. R. C., Lopes, A. C. S., Franco, B. D. G. M., Todorov, S. D., 2015. Artisanal coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Dairy Sci. Technol.* 95, 209–230.
- Shao, Y., Zhang, W., Guo, H., Pan, L., Zhang, H., Sun, T., 2015. Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Cont.* 50, 250-258.
- Sheehan, V. M., Ross, P., Fitzgerald, G. F., 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8, 279–284.

- Singh, T., Kaur, G., Malik, R., Schillinger, U., Guigas, C., Kapila, S., 2012. Characterization of intestinal *Lactobacillus reuteri* strains as potential probiotics. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 4, 47-58.
- Solieri, L., Bianchi, A., Mottolese, G., Lemmetti, F., Giudici, P., 2014. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. *Food Microbiol.* 38, 240-249.
- Stack, H. M., Kearney, N., Stanton, C., Fitzgerald, F. G., Ross, R.P., 2010. Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 500-507.
- Sun, Z., Harris, H. M. B., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I. B., Cooney, J. C., Kagawa, T. F., Liu, W., Song, Y., Salvetti, E., Wrobel, A., Rasinkangas, P., Parkhill, J., Rea, M. C., O'Sullivan, O., Ritari, J., Douillard, F. P., Ross, R. P., Yang, R., Briner, A. E., Felis, G. E., de Vos, W. M., Barrangou, R., Klaenhammer, T. R., Caufield, P. W. Cui, Y., Zhang, H., O'Toole, P. W., 2015. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat. Commun.* 6, 1-13.
- Todorov, S. D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, L., Wachsman, M. B., Holzapfel, W. H., Dicks, L. M., 2008. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 104, 465–477.
- Toscano, M., Grandi, R., Miniello, V. L., Mattina, R., Drago, L., 2017. Ability of *Lactobacillus kefir* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. *Dig. Liver. Dis.* 49, 261–267.
- Tripathi, M. K., Giri, S. K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods* 9, 225–241.
- Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., Chen, W., 2013. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *J. Dairy Sci.* 96, 4252–4257.
- Van Geel-Schutten, G. H., Flesch, F., Brink, B., Smith, M. R., Dijkhuizen, L., 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 697-703.
- Vijayakumar, M., Llavenil, S., Kim, D. H., Arasu, M. V., Priya, K., Choi, K. C., 2015. In-vitro assessment of the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* KCC-24 isolated from Italian rye-grass (*Lolium multiflorum*) forage. *Anaerobe* 32, 90–97.

- 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 Res. Int.* 36, 895-904.
- Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C. G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., Gobbetti, M., Di Cagno, R., 2012. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiol.* 31, 116-125.
- Xue, C., Zhang, L., Fan, R., Wang, S., Li, H., Luo, X., Liu, W., Song, W., 2015. Protective action of S-layer proteins from *Lactobacillus paracasei* M7 against *Salmonella* infection and mediated inhibition of *Salmonella*-induced apoptosis. *Europ. Food Res. Technol.* 240, 923-929.
- Zárate, G., Chaia, A. P., González, S., Oliver, G., 2000. Viability and β -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J. Food Prot.* 63, 1214-1221.
- Zhou, J. S., Gopal, P. K., Hill, H. S. 2001. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 81–90.
- Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L., 2009. Erythromycin- and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages. *J. Appl. Microbiol.* 170, 1559-168.

Table 1. Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) of different antibiotics against *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts.

| Strains | Antibiotics | | | | | | |
|-------------------------|---------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| | Ampicillin | Chloramphenicol | Clindamycin | Erythromycin | Gentamycin | Kanamycin | Tetracycline |
| <i>L. plantarum</i> 53 | <0.125 ^S | <2 ^S | <0.125 ^S | >1024 ^R | 512 ^R | 128 ^R | 16 ^R |
| <i>L. fermentum</i> 56 | <0.125 ^S | <2 ^S | <0.125 ^S | >1024 ^R | 1024 ^R | 128 ^R | 8 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 60 | <0.125 ^S | <2 ^S | 8 ^R | 32 ^R | 128 ^R | 256 ^R | 32 ^R |
| <i>L. paracasei</i> 106 | <0.125 ^S | <2 ^S | <0.125 ^S | <2 ^R | 32 ^R | 256 ^R | <2 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 139 | <0.125 ^S | <2 ^S | 0.5 ^S | 256 ^R | 64 ^R | 256 ^R | 8 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 141 | <0.125 ^S | <2 ^S | 0.5 ^S | >64 ^R | 32 ^R | 256 ^R | 4 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 250 | <0.125 ^S | <2 ^S | 0.5 ^S | >64 ^R | 128 ^R | 512 ^R | 8 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 263 | <0.125 ^S | <2 ^S | <0.125 ^S | 64 ^R | 16 ^S | 128 ^R | 8 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 296 | <0.125 ^S | <2 ^S | <0.125 ^S | 32 ^R | <2 ^S | 32 ^S | <2 ^S |

Resistant^(R) or Sensitive^(S) profile based on the cut-offs recommended by EFSA (2012).

Table 2. Counts (n = 9, average values ± standard deviation; log cfu/mL) of different *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts when challenged with different pH values and bile salt concentrations (w/v) for different exposure time periods.

| Strains | pH values | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Control (pH 7.2) | | | pH 2 | | | pH 3 | | | pH 5 | | |
| | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h |
| <i>L. plantarum</i> 53 | 6.4 ± 0.2 ^{Aa} | 6.1 ± 0.3 ^{Aa} | 6.6 ± 0.2 ^{Abc} | 3.3 ± 0.2 ^{Bb} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.3 ± 0.2 ^{Bbc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.3 ± 0.2 ^{Ba} | 5.7 ± 0.3 ^{Ab} | 6.0 ± 0.2 ^{ABc} |
| <i>L. fermentum</i> 56 | 6.4 ± 0.3 ^{Aa} | 6.7 ± 0.2 ^{Abcd} | 6.3 ± 0.5 ^{Aabc} | 5.7 ± 0.4 ^{Bc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.6 ± 0.2 ^{Bc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.3 ± 0.3 ^{Bab} | 6.1 ± 0.2 ^{Bc} | 5.5 ± 0.2 ^{Ab} |
| <i>L. fermentum</i> 60 | 6.7 ± 0.2 ^{Aa} | 6.4 ± 0.3 ^{Aab} | 6.4 ± 0.8 ^{Aabcd} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.2 ± 0.2 ^{Bbc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.9 ± 0.3 ^{Abc} | 6.8 ± 0.2 ^{Aef} | 6.6 ± 0.2 ^{Ad} |
| <i>L. paracasei</i> 106 | 6.8 ± 0.5 ^{Aab} | 7.0 ± 0.2 ^{Acde} | 6.5 ± 0.4 ^{Aabc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 5.9 ± 0.2 ^{Bab} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 7.1 ± 0.4 ^{Bc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} |
| <i>L. fermentum</i> 139 | 6.8 ± 0.4 ^{Aab} | 6.6 ± 0.3 ^{Aabcd} | 6.6 ± 0.2 ^{Abc} | 5.2 ± 0.3 ^{Bc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.3 ± 0.5 ^{Bbc} | 5.5 ± 0.5 ^{Bb} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.7 ± 0.5 ^{Babc} | 6.3 ± 0.2 ^{Bcd} | <1 ± 0.0 ^{Aa} |
| <i>L. fermentum</i> 141 | 6.3 ± 0.2 ^{Aa} | 6.0 ± 0.3 ^{Aa} | 6.1 ± 0.2 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.4 ± 0.3 ^{Cbc} | 5.3 ± 0.2 ^{Bb} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.4 ± 0.2 ^{Bab} | 5.8 ± 0.3 ^{Abc} | 5.2 ± 0.3 ^{Ab} |
| <i>L. fermentum</i> 250 | 7.3 ± 0.3 ^{Ab} | 7.4 ± 0.4 ^{Ae} | 7.2 ± 0.8 ^{Abcd} | 5.3 ± 0.2 ^{Bc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 7.0 ± 0.6 ^{Bc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 7.2 ± 0.4 ^{Ac} | 7.1 ± 0.2 ^{Af} | 7.1 ± 0.2 ^{Ae} |
| <i>L. fermentum</i> 263 | 7.5 ± 0.5 ^{Ab} | 7.5 ± 0.6 ^{Ade} | 7.2 ± 0.2 ^{Ad} | 5.4 ± 0.3 ^{Bc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.7 ± 0.6 ^{Bbc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 7.2 ± 0.3 ^{Ac} | 7.2 ± 0.2 ^{Af} | 7.0 ± 0.4 ^{Ade} |
| <i>L. fermentum</i> 296 | 6.7 ± 0.4 ^{Aab} | 6.7 ± 0.5 ^{Aabcde} | 6.9 ± 0.3 ^{Ac} | 5.2 ± 0.2 ^{Bc} | 5.2 ± 0.2 ^{Bb} | 4.7 ± 0.2 ^{Ab} | 5.5 ± 0.2 ^{Ba} | 5.1 ± 0.4 ^{ABb} | 4.8 ± 0.3 ^{Ab} | 6.8 ± 0.3 ^{Aabc} | 6.6 ± 0.2 ^{Ade} | 6.6 ± 0.2 ^{Ad} |
| Strains | Bile salts concentrations | | | | | | | | | | | |
| | Control (0%) | | | 0.15% | | | 0.3% | | | 1% | | |
| | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h |
| <i>L. plantarum</i> 53 | 7.0 ± 0.3 ^{Abc} | 6.8 ± 0.3 ^{Aab} | 6.8 ± 0.2 ^{Abc} | 7.0 ± 0.4 ^{Ad} | 7.1 ± 0.2 ^{Ac} | 7.1 ± 0.2 ^{Ad} | 7.1 ± 0.2 ^{Ac} | 7.1 ± 0.4 ^{Ade} | 6.9 ± 0.2 ^{Af} | 7.2 ± 0.3 ^{Ad} | 7.0 ± 0.3 ^{Ade} | 7.0 ± 0.2 ^{Ac} |
| <i>L. fermentum</i> 56 | 6.0 ± 0.2 ^{Aa} | 6.4 ± 0.3 ^{Aa} | 6.2 ± 0.3 ^{Aa} | 5.9 ± 0.2 ^{Ac} | 5.9 ± 0.5 ^{Ab} | 5.7 ± 0.6 ^{Abc} | 4.9 ± 0.2 ^{Bb} | 4.4 ± 0.3 ^{Ab} | 4.2 ± 0.5 ^{Ab} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} |
| <i>L. fermentum</i> 60 | 6.2 ± 0.3 ^{Aa} | 6.6 ± 0.3 ^{Aa} | 6.5 ± 0.3 ^{Aab} | 5.7 ± 0.3 ^{Ac} | 5.5 ± 0.2 ^{Aa} | 5.3 ± 0.3 ^{Ab} | 5.4 ± 0.4 ^{Ab} | 5.3 ± 0.2 ^{Ac} | 5.0 ± 0.7 ^{Abc} | 5.8 ± 0.3 ^{Ab} | 5.6 ± 0.2 ^{Ab} | 5.2 ± 0.7 ^{Ab} |
| <i>L. paracasei</i> 106 | 7.4 ± 0.5 ^{Abc} | 6.7 ± 0.4 ^{Aab} | 7.0 ± 0.5 ^{Aabc} | 7.1 ± 0.2 ^{Bd} | 6.3 ± 0.3 ^{Ab} | 6.4 ± 0.2 ^{Ac} | 7.1 ± 0.7 ^{Bc} | 6.6 ± 0.5 ^{AB} | 6.0 ± 0.2 ^{Ad} | 7.4 ± 0.3 ^{Bd} | 5.8 ± 0.2 ^{Ab} | 5.5 ± 0.2 ^{Ab} |
| <i>L. fermentum</i> 139 | 6.5 ± 0.4 ^{Aab} | 6.3 ± 0.2 ^{Aa} | 6.5 ± 0.3 ^{Aab} | 4.7 ± 0.2 ^{Ab} | 6.1 ± 0.3 ^{Bb} | 6.5 ± 0.3 ^{Bc} | 6.7 ± 0.2 ^{Ac} | 6.4 ± 0.3 ^{Ad} | 6.1 ± 0.5 ^{Acde} | 6.6 ± 0.2 ^{Ac} | 6.4 ± 0.3 ^{Ac} | 6.0 ± 0.4 ^{Ab} |
| <i>L. fermentum</i> 141 | 6.4 ± 0.2 ^{Aa} | 6.7 ± 0.4 ^{Aab} | 6.7 ± 0.3 ^{Aabc} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} | <1 ± 0.0 ^{Aa} |
| <i>L. fermentum</i> 250 | 7.5 ± 0.3 ^{Ac} | 7.2 ± 0.3 ^{Ab} | 7.2 ± 0.2 ^{Ac} | 7.3 ± 0.4 ^{Bd} | 7.1 ± 0.2 ^{Bc} | 6.2 ± 0.3 ^{Ac} | 7.5 ± 0.8 ^{Ac} | 7.3 ± 0.2 ^{Ae} | 7.2 ± 0.4 ^{Af} | 7.3 ± 0.5 ^{Ac} | 7.4 ± 0.8 ^{Ade} | 7.4 ± 0.4 ^{Ac} |
| <i>L. fermentum</i> 263 | 7.1 ± 0.3 ^{Abc} | 7.2 ± 0.2 ^{Ab} | 6.9 ± 0.3 ^{Abc} | 6.7 ± 0.3 ^{Bd} | 5.7 ± 0.6 ^{Ab} | 6.1 ± 0.2 ^{Ac} | 7.0 ± 0.6 ^{Ac} | 6.9 ± 0.2 ^{Ade} | 6.7 ± 0.2 ^{Aef} | 7.2 ± 0.2 ^{Bd} | 5.9 ± 0.2 ^{Abc} | 6.9 ± 0.3 ^{Bc} |
| <i>L. fermentum</i> 296 | 6.7 ± 0.2 ^{Ab} | 6.1 ± 0.4 ^{Aa} | 6.4 ± 0.2 ^{Aab} | 7.2 ± 0.4 ^{Bd} | 7.2 ± 0.3 ^{Bc} | 6.5 ± 0.2 ^{Ac} | 7.1 ± 0.3 ^{Ac} | 6.9 ± 0.5 ^{Ade} | 6.7 ± 0.4 ^{Aef} | 7.1 ± 0.3 ^{Ad} | 7.3 ± 0.4 ^{Ae} | 7.4 ± 0.1 ^{Ad} |

^{A-C}: different superscript capital letters in the same row denote differences ($P \leq 0.05$) in counts for the tested *Lactobacillus* strain exposed for a pH or bile salts condition for different time intervals, based on Tukey's test; ^{a-l}: different superscript small letters in the same column denote differences ($P \leq 0.05$) in counts of different tested *Lactobacillus* strains when exposed to a pH or bile salts condition and exposure time interval, based on Tukey's test.

Table 3. Physiological functionality and technological properties of different *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts.

Results are expressed as average (n = 9) ± standard deviation, with the exception of diacetyl production.

| Strains | Physiological functionalities | | | | Technological properties | |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| | Hydrophobicity (%) | Autoaggregation (%) | Coaggregation (%) | | EPS production (mg/L) | Diacetyl production |
| | | | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. coli</i> | | |
| <i>L. plantarum</i> 53 | 16.5 ± 1.2 ^d | 37.9 ± 1.8 ^d | 21.8 ± 4.5 ^b | 2.4 ± 0.5 ^a | 46.7 ± 2.1 ^a | + |
| <i>L. fermentum</i> 56 | 19.9 ± 3.1 ^{de} | 20.5 ± 2.5 ^b | 19.1 ± 3.2 ^b | 7.6 ± 1.8 ^b | 48.5 ± 3.2 ^a | + |
| <i>L. fermentum</i> 60 | 17.1 ± 0.8 ^d | 36.2 ± 1.0 ^d | 10.2 ± 2.8 ^a | 30.1 ± 4.8 ^{cd} | 43.4 ± 2.5 ^a | ++ |
| <i>L. paracasei</i> 106 | 23.7 ± 4.8 ^e | 48.4 ± 2.2 ^e | 51.8 ± 2.2 ^d | 41.3 ± 3.1 ^e | 58.2 ± 4.0 ^b | +++ |
| <i>L. fermentum</i> 139 | 43.5 ± 4.7 ^f | 33.8 ± 5.1 ^d | 11.3 ± 1.1 ^a | 30.5 ± 5.3 ^{cd} | 47.4 ± 3.6 ^a | +++ |
| <i>L. fermentum</i> 141 | 16.2 ± 3.3 ^{cd} | 13.6 ± 0.4 ^a | 34.9 ± 2.8 ^c | 7.1 ± 3.1 ^b | 47.0 ± 2.2 ^a | ++ |
| <i>L. fermentum</i> 250 | 9.1 ± 0.8 ^{ab} | 28.6 ± 2.3 ^c | 31.5 ± 2.8 ^c | 24.6 ± 2.0 ^c | 46.8 ± 4.1 ^a | ++ |
| <i>L. fermentum</i> 263 | 10.9 ± 2.4 ^{abc} | 24.9 ± 2.8 ^{bc} | 18.3 ± 3.3 ^b | 7.4 ± 0.8 ^b | 55.1 ± 2.4 ^b | + |
| <i>L. fermentum</i> 296 | 6.7 ± 2.5 ^a | 35.0 ± 4.8 ^d | 22.3 ± 6.4 ^b | 33.5 ± 2.1 ^d | 53.3 ± 3.3 ^{ab} | + |

^{a-f}: different superscript letters in the column denote differences ($P \leq 0.05$) among the tested *Lactobacillus* strains, based on Tukey's test.

Diacetyl production: + (weak diacetyl producer), ++ (medium diacetyl producer) and +++ (high diacetyl producer) considering the intensity of the formed red ring.

Table 4. Antagonistic activities of different *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts against food-related bacteria as measured by spot agar and well diffusion assays. Results are expressed in diameter (mm) of growth inhibition zones (n = 9; average \pm standard deviation).

| Strains | <i>S. aureus</i> INCQS 00015 | | <i>S. Typhimurium</i> INCQS 00150 | | <i>S. Enteritidis</i> INCQS 00258 | | <i>L. monocytogenes</i> INCQS 00266 | | <i>E. coli</i> INCQS 00219 | |
|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Well diffusion | Spot agar | Well diffusion | Spot agar | Well diffusion | Spot agar | Well diffusion | Spot agar | Well diffusion | Spot agar |
| <i>L. plantarum</i> 53 | 4.0 \pm 0.6 ^c | 11.0 \pm 1.0 ^d | 4.0 \pm 0.3 ^d | 8.0 \pm 1.0 ^{bc} | 3.0 \pm 0.2 ^c | 14.0 \pm 1.3 ^b | 3.0 \pm 0.3 ^b | 10.0 \pm 1.0 ^d | 3.0 \pm 1.0 ^{ab} | 7.0 \pm 0.8 ^d |
| <i>L. fermentum</i> 56 | 4.0 \pm 0.8 ^c | 11.0 \pm 0.8 ^d | 3.0 \pm 0.4 ^{bc} | 9.0 \pm 1.0 ^{cd} | 3.0 \pm 0.1 ^c | 9.0 \pm 1.0 ^a | 3.0 \pm 0.5 ^b | 9.0 \pm 0.8 ^d | 3.0 \pm 0.1 ^b | 7.0 \pm 0.6 ^d |
| <i>L. fermentum</i> 60 | 5.0 \pm 0.7 ^c | 11.0 \pm 1.0 ^d | 3.0 \pm 0.1 ^c | 8.0 \pm 0.8 ^b | 2.5 \pm 0.4 ^{bc} | 13.0 \pm 1.0 ^b | 4.0 \pm 0.1 ^c | 7.0 \pm 0.5 ^c | 3.0 \pm 0.4 ^b | 12.0 \pm 1.0 ^e |
| <i>L. paracasei</i> 106 | <1 \pm 0.0 ^a | <1 \pm 0.0 ^a | 3.0 \pm 0.3 ^{bc} | 10.0 \pm 0.5 ^d | 3.5 \pm 0.6 ^c | 9.0 \pm 0.8 ^a | 2.0 \pm 0.5 ^a | 6.0 \pm 0.2 ^b | 3.0 \pm 0.2 ^b | 6.0 \pm 0.5 ^{cd} |
| <i>L. fermentum</i> 139 | 5.0 \pm 0.4 ^c | 4.0 \pm 0.7 ^b | 3.0 \pm 0.5 ^{bc} | 10.0 \pm 1.0 ^{cd} | 3.0 \pm 0.5 ^{bc} | 14.0 \pm 1.0 ^b | 2.0 \pm 0.4 ^a | 7.0 \pm 1.0 ^{bc} | 3.0 \pm 0.3 ^b | 4.0 \pm 0.3 ^a |
| <i>L. fermentum</i> 141 | <1 \pm 0.0 ^a | 6.0 \pm 0.4 ^c | 2.5 \pm 0.2 ^b | 11.0 \pm 1.0 ^d | 3.0 \pm 0.4 ^c | 14.0 \pm 1.5 ^b | 2.0 \pm 0.8 ^{ab} | 4.0 \pm 0.5 ^a | 3.0 \pm 0.5 ^b | 5.0 \pm 0.5 ^{bc} |
| <i>L. fermentum</i> 250 | <1 \pm 0.0 ^a | 6.0 \pm 0.2 ^c | 2.0 \pm 0.1 ^a | 11.0 \pm 0.8 ^d | 2.0 \pm 0.1 ^a | 12.0 \pm 1.0 ^b | 2.5 \pm 0.5 ^{ab} | 9.0 \pm 0.6 ^d | 2.0 \pm 0.2 ^a | 6.0 \pm 0.4 ^d |
| <i>L. fermentum</i> 263 | 2.0 \pm 0.5 ^b | 6.0 \pm 0.5 ^c | 3.0 \pm 0.1 ^b | 6.0 \pm 0.5 ^a | 2.0 \pm 0.3 ^a | 9.0 \pm 0.5 ^a | 3.0 \pm 0.3 ^b | 7.0 \pm 0.8 ^{bc} | 3.0 \pm 0.5 ^b | 7.0 \pm 0.7 ^d |
| <i>L. fermentum</i> 296 | <1 \pm 0.0 ^a | 7.0 \pm 1.0 ^c | 2.5 \pm 0.8 ^{abc} | 6.0 \pm 0.3 ^a | 2.0 \pm 0.5 ^{ab} | 9.0 \pm 0.7 ^a | 3.0 \pm 0.6 ^b | 7.0 \pm 0.4 ^c | 3.0 \pm 0.6 ^b | 5.0 \pm 0.3 ^b |

^{a - d}: different superscript small letters in the same column denote differences ($P \leq 0.05$) among the different tested *Lactobacillus* strains, based on Tukey's test. Growth inhibition zone >1 mm as considered as positive antagonistic activity (Jacobsen et al., 1999).

Table 5. Percent survival rates (n: 9; average \pm standard deviation) of different *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts after 24 h-exposure to different NaCl concentrations.

| Strains | NaCl concentrations (w/v) | | | | |
|-------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | 1% | 2% | 3% | 4% | 5% |
| <i>L. plantarum</i> 53 | 81.1 \pm 2.5 ^{Da} | 8.1 \pm 0.2 ^{Ca} | 7.2 \pm 0.1 ^{Bb} | 6.8 \pm 0.2 ^{Ab} | 6.3 \pm 0.3 ^{Ab} |
| <i>L. fermentum</i> 56 | 92.7 \pm 0.2 ^{Dc} | 83.8 \pm 5.5 ^{Ccd} | 77.7 \pm 1.2 ^{Cef} | 32.3 \pm 4.2 ^{Bc} | 13.2 \pm 0.6 ^{Ad} |
| <i>L. fermentum</i> 60 | 91.4 \pm 0.2 ^{Eb} | 16.6 \pm 3.1 ^{Db} | 9.2 \pm 0.3 ^{Cc} | 7.1 \pm 0.6 ^{Bb} | 5.3 \pm 0.8 ^{Ab} |
| <i>L. paracasei</i> 106 | 87.7 \pm 4.6 ^{Dab} | 6.4 \pm 2.3 ^{Ca} | 4.6 \pm 0.6 ^{Ca} | 2.9 \pm 0.3 ^{Ba} | 1.7 \pm 0.5 ^{Aa} |
| <i>L. fermentum</i> 139 | 95.3 \pm 1.0 ^{Ee} | 84.7 \pm 2.2 ^{Dc} | 68.9 \pm 4.3 ^{Cd} | 29.4 \pm 0.7 ^{Bc} | 11.3 \pm 0.5 ^{Ac} |
| <i>L. fermentum</i> 141 | 95.4 \pm 0.8 ^{De} | 91.1 \pm 4.2 ^{Dcde} | 84.7 \pm 0.6 ^{Cg} | 59.6 \pm 0.3 ^{Be} | 16.0 \pm 2.2 ^{Ae} |
| <i>L. fermentum</i> 250 | 92.3 \pm 1.7 ^{Ebcd} | 84.0 \pm 3.0 ^{Dc} | 75.7 \pm 2.6 ^{Cde} | 42.2 \pm 0.4 ^{Bd} | 15.0 \pm 2.5 ^{Ade} |
| <i>L. fermentum</i> 263 | 94.5 \pm 1.0 ^{Ede} | 89.7 \pm 1.0 ^{Dde} | 81.6 \pm 2.7 ^{Cfg} | 58.6 \pm 3.8 ^{Be} | 15.6 \pm 1.9 ^{Ade} |
| <i>L. fermentum</i> 296 | 95.2 \pm 2.8 ^{Ecede} | 91.1 \pm 0.8 ^{De} | 85.6 \pm 1.9 ^{Cg} | 42.5 \pm 2.5 ^{Bd} | 7.7 \pm 3.9 ^{Abc} |

^{A-E}: different superscript capital letters in the same row denote differences ($P \leq 0.05$) in percent survival rates for the tested *Lactobacillus* strain when exposed to different NaCl concentrations, based on Tukey's test;

^{a-g}: different superscript small letters in the same column denote differences ($P \leq 0.05$) in percent survival rates among the tested *Lactobacillus* strains when exposed to the same NaCl concentration, based on Tukey's test.

S1. Counts (n = 9; average values \pm standard deviation; log cfu/mL) of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts when exposed to different phases of the simulated gastrointestinal digestion in grape juice, milk and Man, Rogosa & Sharpe (MRS) broth.

| Phase | <i>L. plantarum</i> 53 | | |
|-------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | Grape juice | Milk | MRS broth |
| 1 | 5.4 \pm 1.2 ^{Ac} | 6.4 \pm 0.4 ^{Aa} | 6.6 \pm 0.5 ^{Aa} |
| 2 | 4.6 \pm 1.7 ^{Abc} | 6.3 \pm 0.3 ^{ABa} | 6.6 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 3 | 4.6 \pm 1.7 ^{Abc} | 6.4 \pm 0.3 ^{ABa} | 6.7 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 4 | 4.1 \pm 1.7 ^{Abc} | 6.3 \pm 0.3 ^{Ba} | 6.7 \pm 0.4 ^{Ba} |
| 5 | 3.8 \pm 1.6 ^{Abc} | 6.3 \pm 0.3 ^{Ba} | 6.7 \pm 0.5 ^{Ba} |
| 6 | 3.3 \pm 1.4 ^{Aabc} | 6.2 \pm 0.3 ^{Ba} | 6.7 \pm 0.3 ^{Ba} |
| 7 | 2.7 \pm 1.1 ^{Aab} | 6.2 \pm 0.4 ^{Ba} | 6.8 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 8 | <1 \pm 0.0 ^{Aa} | 6.3 \pm 0.4 ^{Ba} | 6.8 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 9 | <1 \pm 0.0 ^{Aa} | 6.6 \pm 0.5 ^{Ba} | 6.9 \pm 0.2 ^{Ba} |
| Phase | <i>L. fermentum</i> 56 | | |
| | Grape juice | Milk | MRS broth |
| 1 | 5.1 \pm 1.9 ^{Ac} | 5.8 \pm 0.5 ^{Aa} | 6.5 \pm 0.3 ^{Aa} |
| 2 | 4.7 \pm 1.8 ^{Abc} | 5.8 \pm 0.4 ^{Aa} | 6.3 \pm 0.2 ^{Aa} |
| 3 | 4.5 \pm 1.8 ^{Abc} | 5.8 \pm 0.4 ^{Aa} | 6.3 \pm 0.2 ^{Aa} |
| 4 | 4.2 \pm 1.9 ^{Abc} | 5.7 \pm 0.4 ^{Aa} | 6.3 \pm 0.3 ^{Aa} |
| 5 | 3.9 \pm 1.8 ^{Abc} | 5.6 \pm 0.4 ^{Aa} | 6.3 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 6 | 3.4 \pm 1.6 ^{Aabc} | 5.5 \pm 0.4 ^{Ba} | 6.3 \pm 0.3 ^{Ca} |
| 7 | 2.6 \pm 0.3 ^{Aab} | 5.4 \pm 0.4 ^{Ba} | 6.3 \pm 0.2 ^{Ca} |
| 8 | <1 \pm 0.0 ^{Aa} | 5.2 \pm 0.5 ^{Ba} | 6.3 \pm 0.2 ^{Ca} |
| 9 | <1 \pm 0.0 ^{Aa} | 5.2 \pm 0.6 ^{Ba} | 6.2 \pm 0.2 ^{Ca} |
| Phase | <i>L. fermentum</i> 60 | | |
| | Grape juice | Milk | MRS broth |
| 1 | 5.4 \pm 1.7 ^{Ab} | 6.0 \pm 0.4 ^{Aa} | 6.4 \pm 0.3 ^{Aa} |
| 2 | 5.1 \pm 1.9 ^{Ab} | 5.9 \pm 0.3 ^{Aa} | 6.3 \pm 0.3 ^{Aa} |
| 3 | 4.8 \pm 1.9 ^{Ab} | 5.9 \pm 0.3 ^{Aa} | 6.3 \pm 0.2 ^{Aa} |
| 4 | 4.6 \pm 2.0 ^{Ab} | 5.9 \pm 0.2 ^{Aa} | 6.3 \pm 0.3 ^{Aa} |
| 5 | 4.2 \pm 2.0 ^{Ab} | 5.8 \pm 0.2 ^{Aa} | 6.3 \pm 0.3 ^{Aa} |
| 6 | 3.7 \pm 1.8 ^{Aab} | 5.8 \pm 0.2 ^{Ba} | 6.2 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 7 | 2.9 \pm 1.4 ^{Aab} | 5.8 \pm 0.2 ^{Ba} | 6.2 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 8 | <1 \pm 0.0 ^{Aa} | 5.7 \pm 0.3 ^{Ba} | 6.3 \pm 0.2 ^{Ca} |
| 9 | <1 \pm 0.0 ^{Aa} | 5.9 \pm 0.3 ^{Ba} | 6.4 \pm 0.2 ^{Ba} |
| Phase | <i>L. paracasei</i> 106 | | |
| | Grape juice | Milk | MRS broth |
| 1 | 4.6 \pm 2.2 ^{Ab} | 6.2 \pm 1.4 ^{Ac} | 6.8 \pm 0.4 ^{Aa} |
| 2 | 3.8 \pm 1.9 ^{Aab} | 6.1 \pm 1.2 ^{Abc} | 6.7 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 3 | 3.5 \pm 1.8 ^{Aab} | 6.0 \pm 1.2 ^{Abc} | 6.7 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 4 | 3.1 \pm 1.7 ^{Aab} | 5.8 \pm 1.2 ^{ABbc} | 6.7 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 5 | 2.6 \pm 1.3 ^{Aab} | 5.6 \pm 1.3 ^{Babc} | 6.6 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 6 | <1 \pm 0.0 ^{Aa} | 5.2 \pm 1.1 ^{Babc} | 6.6 \pm 0.2 ^{Ca} |
| 7 | <1 \pm 0.0 ^{Aa} | 4.9 \pm 1.1 ^{Babc} | 6.6 \pm 0.3 ^{Ca} |
| 8 | <1 \pm 0.0 ^{Aa} | 4.2 \pm 0.4 ^{Bab} | 6.5 \pm 0.6 ^{Ca} |
| 9 | <1 \pm 0.0 ^{Aa} | 4.2 \pm 0.3 ^{Ba} | 6.5 \pm 0.8 ^{Ca} |
| Phase | <i>L. fermentum</i> 139 | | |
| | Grape juice | Milk | MRS broth |
| 1 | 4.9 \pm 1.6 ^{Ab} | 5.9 \pm 0.5 ^{Aa} | 6.2 \pm 0.3 ^{Aa} |
| 2 | 4.6 \pm 1.8 ^{Ab} | 5.7 \pm 0.3 ^{Aa} | 6.2 \pm 0.2 ^{Aa} |
| 3 | 4.4 \pm 1.8 ^{Ab} | 5.7 \pm 0.3 ^{Aa} | 6.2 \pm 0.3 ^{Aa} |
| 4 | 4.1 \pm 1.7 ^{Ab} | 5.6 \pm 0.3 ^{Aa} | 6.2 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 5 | 3.7 \pm 1.6 ^{Ab} | 5.6 \pm 0.3 ^{Aa} | 6.2 \pm 0.2 ^{Ba} |
| 6 | 3.2 \pm 1.3 ^{Aab} | 5.5 \pm 0.3 ^{Ba} | 6.2 \pm 0.3 ^{Ca} |

| | | | |
|-------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 7 | 2.6 ± 1.0 ^{Aab} | 5.4 ± 0.3 ^{Ba} | 6.2 ± 0.4 ^{Ca} |
| 8 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 5.2 ± 0.2 ^{Ba} | 6.2 ± 0.6 ^{Ca} |
| 9 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 5.2 ± 0.3 ^{Ba} | 6.2 ± 0.3 ^{Ca} |
| Phase | <i>L. fermentum</i> 141 | | |
| | Grape juice | Milk | MRS broth |
| 1 | 4.4 ± 1.8 ^{Ab} | 5.7 ± 1.5 ^{Ab} | 6.6 ± 0.5 ^{Aa} |
| 2 | 4.1 ± 1.8 ^{Ab} | 5.7 ± 1.2 ^{ABb} | 6.7 ± 0.2 ^{Ba} |
| 3 | 3.8 ± 1.8 ^{Aab} | 5.6 ± 1.2 ^{ABb} | 6.7 ± 0.2 ^{Ba} |
| 4 | 3.4 ± 1.6 ^{Aab} | 5.5 ± 1.3 ^{ABb} | 6.8 ± 0.2 ^{Ba} |
| 5 | 2.9 ± 1.3 ^{Aab} | 5.3 ± 1.3 ^{ABb} | 6.8 ± 0.2 ^{Ba} |
| 6 | 2.4 ± 0.8 ^{Aab} | 5.0 ± 1.3 ^{Bab} | 6.8 ± 0.2 ^{Ca} |
| 7 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 4.6 ± 1.4 ^{Bab} | 6.8 ± 0.2 ^{Ca} |
| 8 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 3.7 ± 0.2 ^{Ba} | 6.8 ± 0.3 ^{Ca} |
| 9 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 3.7 ± 0.2 ^{Ba} | 7.0 ± 0.3 ^{Ca} |
| Phase | <i>L. fermentum</i> 250 | | |
| | Grape juice | Milk | MRS broth |
| 1 | 4.9 ± 1.8 ^{Ab} | 6.1 ± 0.2 ^{Aa} | 6.4 ± 0.3 ^{Aa} |
| 2 | 4.8 ± 1.9 ^{Ab} | 6.1 ± 0.2 ^{Aa} | 6.6 ± 0.2 ^{Aa} |
| 3 | 4.6 ± 1.9 ^{Ab} | 6.1 ± 0.2 ^{Aa} | 6.5 ± 0.2 ^{Aa} |
| 4 | 4.2 ± 1.9 ^{Ab} | 6.1 ± 0.2 ^{Aa} | 6.5 ± 0.4 ^{Aa} |
| 5 | 3.8 ± 1.7 ^{Ab} | 6.1 ± 0.2 ^{Ba} | 6.4 ± 0.2 ^{Ba} |
| 6 | 3.2 ± 1.3 ^{Aab} | 6.1 ± 0.3 ^{Ba} | 6.4 ± 0.3 ^{Ba} |
| 7 | 2.6 ± 0.7 ^{Aab} | 6.1 ± 0.3 ^{Ba} | 6.4 ± 0.3 ^{Ba} |
| 8 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.3 ± 0.2 ^{Ba} | 6.3 ± 0.4 ^{Ba} |
| 9 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 6.3 ± 0.2 ^{Ba} | 6.4 ± 0.4 ^{Ba} |
| Phase | <i>L. fermentum</i> 263 | | |
| | Grape juice | Milk | MRS broth |
| 1 | 4.2 ± 2.1 ^{Ab} | 5.7 ± 0.8 ^{Ac} | 6.3 ± 0.4 ^{Aa} |
| 2 | 3.9 ± 2.0 ^{Aab} | 5.6 ± 1.0 ^{Ac} | 6.2 ± 0.3 ^{Aa} |
| 3 | 3.6 ± 1.9 ^{Aab} | 5.6 ± 1.0 ^{Abc} | 6.2 ± 0.2 ^{Ba} |
| 4 | 3.2 ± 1.8 ^{Aab} | 5.4 ± 1.1 ^{ABbc} | 6.2 ± 0.2 ^{Ba} |
| 5 | 2.6 ± 1.4 ^{Aab} | 5.2 ± 1.1 ^{Babc} | 6.2 ± 0.2 ^{Ba} |
| 6 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 5.0 ± 1.1 ^{Babc} | 6.2 ± 0.2 ^{Ba} |
| 7 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 4.6 ± 0.5 ^{Babc} | 6.2 ± 0.2 ^{Ca} |
| 8 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 4.0 ± 0.2 ^{Ba} | 6.2 ± 0.3 ^{Ca} |
| 9 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 4.1 ± 0.3 ^{Bab} | 6.3 ± 0.2 ^{Ca} |
| Phase | <i>L. fermentum</i> 296 | | |
| | Grape juice | Milk | MRS broth |
| 1 | 4.8 ± 1.9 ^{Ab} | 6.2 ± 1.0 ^{Ab} | 6.1 ± 0.4 ^{Aa} |
| 2 | 4.6 ± 2.2 ^{Ab} | 6.2 ± 0.9 ^{Ab} | 6.0 ± 0.3 ^{Aa} |
| 3 | 4.3 ± 2.2 ^{Ab} | 6.1 ± 0.9 ^{Ab} | 6.0 ± 0.3 ^{Aa} |
| 4 | 4.0 ± 2.1 ^{Aab} | 6.0 ± 0.9 ^{Aab} | 6.1 ± 0.3 ^{Aa} |
| 5 | 3.4 ± 1.9 ^{Aab} | 5.8 ± 1.0 ^{ABab} | 6.1 ± 0.3 ^{Ba} |
| 6 | 2.8 ± 1.4 ^{Aab} | 5.6 ± 1.0 ^{Bab} | 6.0 ± 0.4 ^{Ba} |
| 7 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 5.3 ± 1.0 ^{Bab} | 5.9 ± 0.4 ^{Ba} |
| 8 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 4.7 ± 0.4 ^{Ba} | 5.7 ± 0.2 ^{Ca} |
| 9 | <1 ± 0.0 ^{Aa} | 5.0 ± 0.3 ^{Bab} | 5.7 ± 0.2 ^{Ca} |

Phase 1: mouth conditions, pH 6.9, exposure time 2 min; phase 2: esophagus-stomach conditions, pH 5.5, exposure time 12 min; phase 3: esophagus-stomach conditions, pH 4.6, exposure time 22 min; phase 4: stomach conditions, pepsin, pH 3.8, exposure time 32 min; phase 5: stomach conditions, pepsin, pH 2.8, exposure time 52 min; phase 6: stomach conditions, pepsin, pH 2.3, exposure time 72 min; phase 7: stomach conditions, pepsin, pH 2, exposure time 92 min; phase 8: duodenum conditions, pancreatin + bile salts, pH 5, exposure time 122 min; phase 9: ileal conditions, pH 6.5, exposure time 182 min.

^{A - C}: different superscript capital letters in the same row denote differences ($P \leq 0.05$) in counts of the tested *Lactobacillus* strain when exposed for the same simulated digestion phase in grape juice, milk and MRS broth, based on Tukey's test.

^{a - c}: different superscript small letters in the same column denote differences ($P \leq 0.05$) in counts of the tested *Lactobacillus* strain when exposed for the different phases of the simulated digestion in grape juice, milk or MRS broth, based on Tukey's test.

APÊNDICE B

Tabela 1. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de diferentes antibióticos frente a diferentes cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas.

| Cepas | Antibióticos | | | | | | |
|-------------------------|---------------------|------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-------------------|-----------------|
| | Ampicilina | Canamicina | Cloranfenicol | Clindamicina | Eritromicina | Gentamicina | Tetraciclina |
| <i>L. plantarum</i> 53 | <0,125 ^S | 128 ^R | <2 ^S | <0,125 ^S | >1024 ^R | 512 ^R | 16 ^R |
| <i>L. fermentum</i> 56 | <0,125 ^S | 128 ^R | <2 ^S | <0,125 ^S | >1024 ^R | 1024 ^R | 8 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 60 | <0,125 ^S | 256 ^R | <2 ^S | 8 ^R | 32 ^R | 128 ^R | 32 ^R |
| <i>L. paracasei</i> 106 | <0,125 ^S | 256 ^R | <2 ^S | <0,125 ^S | <2 ^R | 32 ^R | <2 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 139 | <0,125 ^S | 256 ^R | <2 ^S | 0,5 ^S | 256 ^R | 64 ^R | 8 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 141 | <0,125 ^S | 256 ^R | <2 ^S | 0,5 ^S | >64 ^R | 32 ^R | 4 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 250 | <0,125 ^S | 512 ^R | <2 ^S | 0,5 ^S | >64 ^R | 128 ^R | 8 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 263 | <0,125 ^S | 128 ^R | <2 ^S | <0,125 ^S | 64 ^R | 16 ^S | 8 ^S |
| <i>L. fermentum</i> 296 | <0,125 ^S | 32 ^S | <2 ^S | <0,125 ^S | 32 ^R | <2 ^S | <2 ^S |

Resistente^(R) ou Susceptível^(S) com base nos valores-limites recomendados pela EFSA (2012).

Tabela 2. Segurança e funcionalidade fisiológica de diferentes cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas. Resultados foram expressos como média (n = 9) ± desvio padrão, com exceção de atividade hemolítica, degradação da mucina e desconjugação de sais biliares.

| Cepas | Atividade hemolítica | | | Degradação da mucina | | Desconjugação de sais biliares | Hidrofobicidade (%) | Autoagregação (%) | Coagregação (%) | |
|-------------------------|----------------------|---------|----------|----------------------|-----------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | α | β | γ | + Glicose | - Glicose | | | | <i>L. monocytogenes</i> | <i>E. coli</i> |
| <i>L. plantarum</i> 53 | - | - | + | - | - | - | 16,5 ± 1,2 ^d | 37,9 ± 1,8 ^d | 21,8 ± 4,5 ^b | 2,4 ± 0,5 ^a |
| <i>L. fermentum</i> 56 | - | - | + | - | - | - | 19,9 ± 3,1 ^{de} | 20,5 ± 2,5 ^b | 19,1 ± 3,2 ^b | 7,6 ± 1,8 ^b |
| <i>L. fermentum</i> 60 | - | - | + | - | - | - | 17,1 ± 0,8 ^d | 36,2 ± 1,0 ^d | 10,2 ± 2,8 ^a | 30,1 ± 4,8 ^{cd} |
| <i>L. paracasei</i> 106 | - | - | + | - | - | - | 23,7 ± 4,8 ^e | 48,4 ± 2,2 ^e | 51,8 ± 2,2 ^d | 41,3 ± 3,1 ^e |
| <i>L. fermentum</i> 139 | - | - | + | - | - | - | 43,5 ± 4,7 ^f | 33,8 ± 5,1 ^d | 11,3 ± 1,1 ^a | 30,5 ± 5,3 ^{cd} |
| <i>L. fermentum</i> 141 | - | - | + | - | - | - | 16,2 ± 3,3 ^{cd} | 13,6 ± 0,4 ^a | 34,9 ± 2,8 ^c | 7,1 ± 3,1 ^b |
| <i>L. fermentum</i> 250 | - | - | + | - | - | - | 9,1 ± 0,8 ^{ab} | 28,6 ± 2,3 ^c | 31,5 ± 2,8 ^c | 24,6 ± 2,0 ^c |
| <i>L. fermentum</i> 263 | - | - | + | - | - | - | 10,9 ± 2,4 ^{abc} | 24,9 ± 2,8 ^{bc} | 18,3 ± 3,3 ^b | 7,4 ± 0,8 ^b |
| <i>L. fermentum</i> 296 | - | - | + | - | - | - | 6,7 ± 2,5 ^a | 35,0 ± 4,8 ^d | 22,3 ± 6,4 ^b | 33,5 ± 2,1 ^d |

^{a-f}: diferentes letras sobscritas na coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre as cepas de *Lactobacillus* testadas, baseado no teste de Tukey.

Atividade hemolítica, degradação da mucina e desconjugação de sais biliares: + (positivo) ou - (negativo).

Tabela 3. Contagens (n = 9, valores em média ± desvio padrão; log UFC/mL) de diferentes cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas quando submetidas a diferentes valores de pH e concentrações de sais biliares (p/v) para diferentes tempos de exposição.

| Cepas | Valores de pH | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Controle (pH 7,2) | | | pH 2 | | | pH 3 | | | pH 5 | | |
| | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h |
| <i>L. plantarum</i> 53 | 6,4 ± 0,2 ^{Aa} | 6,1 ± 0,3 ^{Aa} | 6,6 ± 0,2 ^{Abc} | 3,3 ± 0,2 ^{Bb} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,3 ± 0,2 ^{Bbc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,3 ± 0,2 ^{Ba} | 5,7 ± 0,3 ^{Ab} | 6,0 ± 0,2 ^{ABc} |
| <i>L. fermentum</i> 56 | 6,4 ± 0,3 ^{Aa} | 6,7 ± 0,2 ^{Abcd} | 6,3 ± 0,5 ^{Aabc} | 5,7 ± 0,4 ^{Bc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,6 ± 0,2 ^{Bc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,3 ± 0,3 ^{Bab} | 6,1 ± 0,2 ^{Bc} | 5,5 ± 0,2 ^{Ab} |
| <i>L. fermentum</i> 60 | 6,7 ± 0,2 ^{Aa} | 6,4 ± 0,3 ^{Aab} | 6,4 ± 0,8 ^{Aabcd} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,2 ± 0,2 ^{Bbc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,9 ± 0,3 ^{Abe} | 6,8 ± 0,2 ^{Aef} | 6,6 ± 0,2 ^{Ad} |
| <i>L. paracasei</i> 106 | 6,8 ± 0,5 ^{Aab} | 7,0 ± 0,2 ^{Acde} | 6,5 ± 0,4 ^{Aabc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 5,9 ± 0,2 ^{Bab} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 7,1 ± 0,4 ^{Bc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} |
| <i>L. fermentum</i> 139 | 6,8 ± 0,4 ^{Aab} | 6,6 ± 0,3 ^{Aabcd} | 6,6 ± 0,2 ^{Abc} | 5,2 ± 0,3 ^{Bc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,3 ± 0,5 ^{Bbc} | 5,5 ± 0,5 ^{Bb} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,7 ± 0,5 ^{Babc} | 6,3 ± 0,2 ^{Bcd} | <1 ± 0,0 ^{Aa} |
| <i>L. fermentum</i> 141 | 6,3 ± 0,2 ^{Aa} | 6,0 ± 0,3 ^{Aa} | 6,1 ± 0,2 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,4 ± 0,3 ^{Cbc} | 5,3 ± 0,2 ^{Bb} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,4 ± 0,2 ^{Bab} | 5,8 ± 0,3 ^{Abc} | 5,2 ± 0,3 ^{Ab} |
| <i>L. fermentum</i> 250 | 7,3 ± 0,3 ^{Ab} | 7,4 ± 0,4 ^{Ae} | 7,2 ± 0,8 ^{Abcd} | 5,3 ± 0,2 ^{Bc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 7,0 ± 0,6 ^{Bc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 7,2 ± 0,4 ^{Ac} | 7,1 ± 0,2 ^{Af} | 7,1 ± 0,2 ^{Ae} |
| <i>L. fermentum</i> 263 | 7,5 ± 0,5 ^{Ab} | 7,5 ± 0,6 ^{Ade} | 7,2 ± 0,2 ^{Ad} | 5,4 ± 0,3 ^{Bc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 6,7 ± 0,6 ^{Bbc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 7,2 ± 0,3 ^{Ac} | 7,2 ± 0,2 ^{Af} | 7,0 ± 0,4 ^{Ade} |
| <i>L. fermentum</i> 296 | 6,7 ± 0,4 ^{Aab} | 6,7 ± 0,5 ^{Aabcde} | 6,9 ± 0,3 ^{Acde} | 5,2 ± 0,2 ^{Bc} | 5,2 ± 0,2 ^{Bb} | 4,7 ± 0,2 ^{Ab} | 5,5 ± 0,2 ^{Ba} | 5,1 ± 0,4 ^{ABb} | 4,8 ± 0,3 ^{Ab} | 6,8 ± 0,3 ^{Aabc} | 6,6 ± 0,2 ^{Ade} | 6,6 ± 0,2 ^{Ad} |
| Cepas | Concentrações de sais biliares | | | | | | | | | | | |
| | Controle (0%) | | | 0,15% | | | 0,3% | | | 1% | | |
| | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h | 1 h | 2 h | 3 h |
| <i>L. plantarum</i> 53 | 7,0 ± 0,3 ^{Abc} | 6,8 ± 0,3 ^{Aab} | 6,8 ± 0,2 ^{Abc} | 7,0 ± 0,4 ^{Ad} | 7,1 ± 0,2 ^{Ac} | 7,1 ± 0,2 ^{Ad} | 7,1 ± 0,2 ^{Ac} | 7,1 ± 0,4 ^{Ade} | 6,9 ± 0,2 ^{Af} | 7,2 ± 0,3 ^{Ad} | 7,0 ± 0,3 ^{Ade} | 7,0 ± 0,2 ^{Ac} |
| <i>L. fermentum</i> 56 | 6,0 ± 0,2 ^{Aa} | 6,4 ± 0,3 ^{Aa} | 6,2 ± 0,3 ^{Aa} | 5,9 ± 0,2 ^{Ac} | 5,9 ± 0,5 ^{Ab} | 5,7 ± 0,8 ^{Ab} | 4,9 ± 0,2 ^{Bb} | 4,0 ± 0,3 ^{Ab} | 4,0 ± 0,5 ^{Ab} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} |
| <i>L. fermentum</i> 60 | 6,2 ± 0,3 ^{Aa} | 6,6 ± 0,3 ^{Aa} | 6,5 ± 0,3 ^{Aab} | 4,7 ± 0,3 ^{Bb} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | 5,4 ± 0,4 ^{Ab} | 5,3 ± 0,2 ^{Ac} | 5,0 ± 0,7 ^{Abc} | 5,8 ± 0,3 ^{Ab} | 5,6 ± 0,2 ^{Ab} | 5,2 ± 0,7 ^{Ab} |
| <i>L. paracasei</i> 106 | 7,4 ± 0,5 ^{Abc} | 6,7 ± 0,4 ^{Aab} | 7,0 ± 0,5 ^{Aabc} | 7,1 ± 0,2 ^{Bd} | 6,3 ± 0,3 ^{Ab} | 6,4 ± 0,2 ^{Abc} | 7,1 ± 0,7 ^{Bc} | 6,6 ± 0,5 ^{AB} | 6,0 ± 0,2 ^{Ad} | 7,4 ± 0,3 ^{Bd} | 5,8 ± 0,2 ^{Ab} | 5,5 ± 0,2 ^{Ab} |
| <i>L. fermentum</i> 139 | 6,5 ± 0,4 ^{Aab} | 6,3 ± 0,2 ^{Aa} | 6,5 ± 0,3 ^{Aab} | 4,7 ± 0,2 ^{Ab} | 6,1 ± 0,3 ^{Bb} | 6,5 ± 0,3 ^{Bc} | 6,7 ± 0,2 ^{Ac} | 6,4 ± 0,3 ^{Ad} | 6,1 ± 0,5 ^{Acde} | 6,6 ± 0,2 ^{Ac} | 6,4 ± 0,3 ^{Acde} | 6,0 ± 0,4 ^{Ab} |
| <i>L. fermentum</i> 141 | 6,4 ± 0,2 ^{Aa} | 6,7 ± 0,4 ^{Aab} | 6,7 ± 0,3 ^{Aabc} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} | <1 ± 0,0 ^{Aa} |
| <i>L. fermentum</i> 250 | 7,5 ± 0,3 ^{Ac} | 7,2 ± 0,3 ^{Ab} | 7,2 ± 0,2 ^{Ac} | 7,3 ± 0,4 ^{Bd} | 7,1 ± 0,2 ^{Bc} | 6,2 ± 0,3 ^{Ab} | 7,5 ± 0,8 ^{Ac} | 7,3 ± 0,2 ^{Ae} | 7,2 ± 0,4 ^{Af} | 7,3 ± 0,5 ^{Ac} | 7,4 ± 0,8 ^{Ade} | 7,4 ± 0,4 ^{Acde} |
| <i>L. fermentum</i> 263 | 7,1 ± 0,3 ^{Abc} | 7,2 ± 0,2 ^{Ab} | 6,9 ± 0,3 ^{Abc} | 6,7 ± 0,3 ^{Bd} | 5,7 ± 0,6 ^{Ab} | 6,1 ± 0,2 ^{Ab} | 7,0 ± 0,6 ^{Ac} | 6,9 ± 0,2 ^{Ade} | 6,7 ± 0,2 ^{Aef} | 7,2 ± 0,2 ^{Bd} | 5,9 ± 0,2 ^{Abc} | 6,9 ± 0,3 ^{Bc} |
| <i>L. fermentum</i> 296 | 6,7 ± 0,2 ^{Ab} | 6,1 ± 0,4 ^{Aa} | 6,4 ± 0,2 ^{Aab} | 7,2 ± 0,4 ^{Bd} | 7,2 ± 0,3 ^{Bc} | 6,5 ± 0,2 ^{Abc} | 7,1 ± 0,3 ^{Ac} | 6,9 ± 0,5 ^{Ade} | 6,7 ± 0,4 ^{Aef} | 7,1 ± 0,3 ^{Ad} | 7,3 ± 0,4 ^{Ae} | 7,5 ± 0,2 ^{Ad} |

^{A-C}: diferentes letras maiúsculas sobresscritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) nas contagens das cepas de *Lactobacillus* testadas quando expostas para uma condição de pH ou sais biliares em diferentes intervalos de tempo, baseado no teste de Tukey; ^{a-f}: diferentes letras minúsculas sobresscritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) nas contagens das cepas de *Lactobacillus* quando expostas para uma condição de pH ou sais biliares no mesmo intervalo de tempo de exposição, baseado no teste de Tukey.

Tabela 4. Atividades antagonistas de diferentes cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas frente a bactérias indicadoras mensuradas pelos testes de ágar *spot* e difusão em poço. Os resultados foram expressos como o diâmetro (mm) do halo de inibição de crescimento (n = 9; média ± desvio padrão).

| Cepas | <i>S. aureus</i> INCQS 00015 | | <i>S. Typhimurium</i> INCQS 00150 | | <i>S. Enteritidis</i> INCQS 00258 | | <i>L. monocytogenes</i> INCQS 00266 | | <i>E. coli</i> INCQS 00219 | |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| | Difusão em poço | Ágar <i>spot</i> | Difusão em poço | Ágar <i>spot</i> | Difusão em poço | Ágar <i>spot</i> | Difusão em poço | Ágar <i>spot</i> | Difusão em poço | Ágar <i>spot</i> |
| <i>L. plantarum</i> 53 | 4,0 ± 0,6 ^c | 11,0 ± 1,0 ^d | 4,0 ± 0,3 ^d | 8,0 ± 1,0 ^{bc} | 3,0 ± 0,2 ^c | 14,0 ± 1,3 ^b | 3,0 ± 0,3 ^b | 10,0 ± 1,0 ^d | 3,0 ± 1,0 ^{ab} | 7,0 ± 0,8 ^d |
| <i>L. fermentum</i> 56 | 4,0 ± 0,8 ^c | 11,0 ± 0,8 ^d | 3,0 ± 0,4 ^{bc} | 9,0 ± 1,0 ^{cd} | 3,0 ± 0,1 ^c | 9,0 ± 1,0 ^a | 3,0 ± 0,5 ^b | 9,0 ± 0,8 ^d | 3,0 ± 0,1 ^b | 7,0 ± 0,6 ^d |
| <i>L. fermentum</i> 60 | 5,0 ± 0,7 ^c | 11,0 ± 1,0 ^d | 3,0 ± 0,1 ^c | 8,0 ± 0,8 ^b | 2,5 ± 0,4 ^{bc} | 13,0 ± 1,0 ^b | 4,0 ± 0,1 ^c | 7,0 ± 0,5 ^c | 3,0 ± 0,4 ^b | 12,0 ± 1,0 ^e |
| <i>L. paracasei</i> 106 | <1 ± 0,0 ^a | <1 ± 0,0 ^a | 3,0 ± 0,3 ^{bc} | 10,0 ± 0,5 ^d | 3,5 ± 0,6 ^c | 9,0 ± 0,8 ^a | 2,0 ± 0,5 ^a | 6,0 ± 0,2 ^b | 3,0 ± 0,2 ^b | 6,0 ± 0,5 ^{cd} |
| <i>L. fermentum</i> 139 | 5,0 ± 0,4 ^c | 4,0 ± 0,7 ^b | 3,0 ± 0,5 ^{bc} | 10,0 ± 1,0 ^{cd} | 3,0 ± 0,5 ^{bc} | 14,0 ± 1,0 ^b | 2,0 ± 0,4 ^a | 7,0 ± 1,0 ^{bc} | 3,0 ± 0,3 ^b | 4,0 ± 0,3 ^a |
| <i>L. fermentum</i> 141 | <1 ± 0,0 ^a | 6,0 ± 0,4 ^c | 2,5 ± 0,2 ^b | 11,0 ± 1,0 ^d | 3,0 ± 0,4 ^c | 14,0 ± 1,5 ^b | 2,0 ± 0,8 ^{ab} | 4,0 ± 0,5 ^a | 3,0 ± 0,5 ^b | 5,0 ± 0,5 ^{bc} |
| <i>L. fermentum</i> 250 | <1 ± 0,0 ^a | 6,0 ± 0,2 ^c | 2,0 ± 0,1 ^a | 11,0 ± 0,8 ^d | 2,0 ± 0,1 ^a | 12,0 ± 1,0 ^b | 2,5 ± 0,5 ^{ab} | 9,0 ± 0,6 ^d | 2,0 ± 0,2 ^a | 6,0 ± 0,4 ^d |
| <i>L. fermentum</i> 263 | 2,0 ± 0,5 ^b | 6,0 ± 0,5 ^c | 3,0 ± 0,1 ^b | 6,0 ± 0,5 ^a | 2,0 ± 0,3 ^a | 9,0 ± 0,5 ^a | 3,0 ± 0,3 ^b | 7,0 ± 0,8 ^{bc} | 3,0 ± 0,5 ^b | 7,0 ± 0,7 ^d |
| <i>L. fermentum</i> 296 | <1 ± 0,0 ^a | 7,0 ± 1,0 ^c | 2,5 ± 0,8 ^{abc} | 6,0 ± 0,3 ^a | 2,0 ± 0,5 ^{ab} | 9,0 ± 0,7 ^a | 3,0 ± 0,6 ^b | 7,0 ± 0,4 ^c | 3,0 ± 0,6 ^b | 5,0 ± 0,3 ^b |

^{a-d}: diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre as diferentes cepas de *Lactobacillus* testadas, baseado no teste de Tukey. Halo de inibição de crescimento > 1 mm foi considerado como positivo para atividade antagonista (Jacobsen et al., 1999).

Tabela 5. Propriedades tecnológicas de diferentes cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas. Os resultados para a produção de EPS foi expressa como média (n = 9) \pm desvio padrão.

| Cepas | Atividade proteolítica | Atividade lipolítica | Produção de EPS (mg/L) | Produção de diacetil |
|-------------------------|------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|
| <i>L. plantarum</i> 53 | + | - | 46,7 \pm 2,1 ^a | + |
| <i>L. fermentum</i> 56 | + | - | 48,5 \pm 3,2 ^a | + |
| <i>L. fermentum</i> 60 | + | - | 43,4 \pm 2,5 ^a | ++ |
| <i>L. paracasei</i> 106 | + | - | 58,2 \pm 4,0 ^b | +++ |
| <i>L. fermentum</i> 139 | + | - | 47,4 \pm 3,6 ^a | +++ |
| <i>L. fermentum</i> 141 | + | - | 47,0 \pm 2,2 ^a | ++ |
| <i>L. fermentum</i> 250 | + | - | 46,8 \pm 4,1 ^a | ++ |
| <i>L. fermentum</i> 263 | + | - | 55,1 \pm 2,4 ^b | + |
| <i>L. fermentum</i> 296 | + | - | 53,3 \pm 3,3 ^{ab} | + |

^a - ^b: diferentes letras sobrescritas na coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre as cepas de *Lactobacillus*, baseado no teste de Tukey.

Atividade proteolítica e lipolítica: + (positivo) ou - (negativo).

Produção de diacetil: + (fraco produtor de diacetil), ++ (médio produtor de diacetil) e +++ (forte produtor de diacetil) considerando a intensidade do anel vermelho formado.

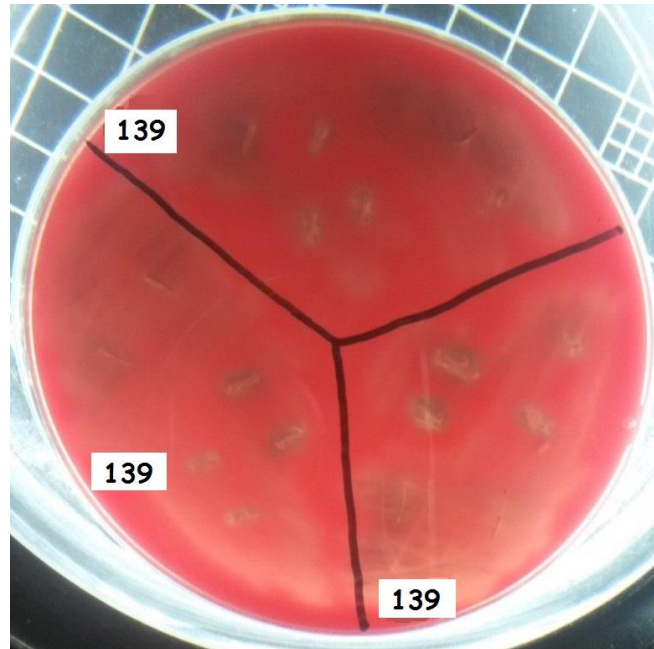
Tabela 6. Percentual de sobrevivência (n = 9; média ± desvio padrão) de diferentes cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de NaCl.

| Cepas | Concentrações de NaCl (p/v) | | | | |
|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | 1% | 2% | 3% | 4% | 5% |
| <i>L. plantarum</i> 53 | 81,1 ± 2,5 ^{Da} | 8,1 ± 0,2 ^{Ca} | 7,2 ± 0,1 ^{Bb} | 6,8 ± 0,2 ^{Ab} | 6,3 ± 0,3 ^{Ab} |
| <i>L. fermentum</i> 56 | 92,7 ± 0,2 ^{Dc} | 83,8 ± 5,5 ^{Ccd} | 77,7 ± 1,2 ^{Cef} | 32,3 ± 4,2 ^{Bc} | 13,2 ± 0,6 ^{Ad} |
| <i>L. fermentum</i> 60 | 91,4 ± 0,2 ^{Eb} | 16,6 ± 3,1 ^{Db} | 9,2 ± 0,3 ^{Cc} | 7,1 ± 0,6 ^{Bb} | 5,3 ± 0,8 ^{Ab} |
| <i>L. paracasei</i> 106 | 87,7 ± 4,6 ^{Dab} | 6,4 ± 2,3 ^{Ca} | 4,6 ± 0,6 ^{Ca} | 2,9 ± 0,3 ^{Ba} | 1,7 ± 0,5 ^{Aa} |
| <i>L. fermentum</i> 139 | 95,3 ± 1,0 ^{Ee} | 84,7 ± 2,2 ^{Dc} | 68,9 ± 4,3 ^{Cd} | 29,4 ± 0,7 ^{Bc} | 11,3 ± 0,5 ^{Ac} |
| <i>L. fermentum</i> 141 | 95,4 ± 0,8 ^{De} | 91,1 ± 4,2 ^{Dcde} | 84,7 ± 0,6 ^{Cg} | 59,6 ± 0,3 ^{Be} | 16,0 ± 2,2 ^{Ae} |
| <i>L. fermentum</i> 250 | 92,3 ± 1,7 ^{Ebcd} | 84,0 ± 3,0 ^{Dc} | 75,7 ± 2,6 ^{Cde} | 42,2 ± 0,4 ^{Bd} | 15,0 ± 2,5 ^{Ade} |
| <i>L. fermentum</i> 263 | 94,5 ± 1,0 ^{Ede} | 89,7 ± 1,0 ^{Dde} | 81,6 ± 2,7 ^{Cfg} | 58,6 ± 3,8 ^{Be} | 15,6 ± 1,9 ^{Ade} |
| <i>L. fermentum</i> 296 | 95,2 ± 2,8 ^{Ecede} | 91,1 ± 0,8 ^{De} | 85,6 ± 1,9 ^{Cg} | 42,5 ± 2,5 ^{Bd} | 7,7 ± 3,9 ^{Abc} |

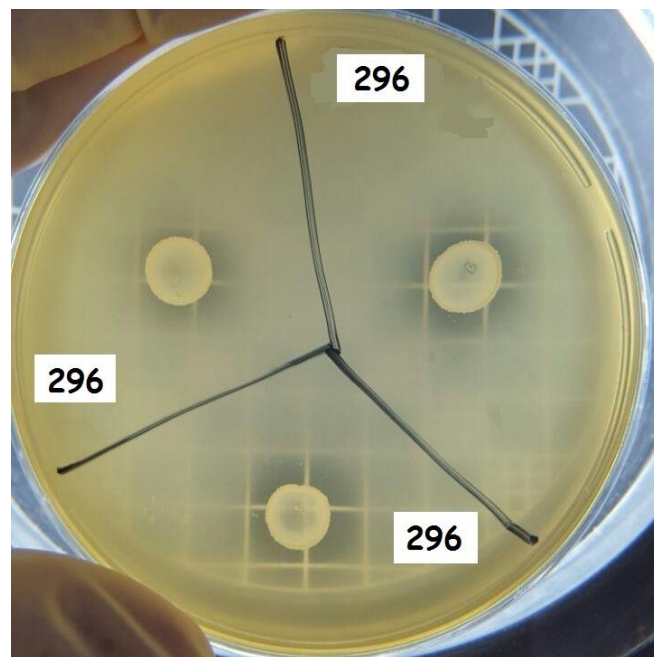
^{A - E}: diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) no percentual de sobrevivência das cepas de *Lactobacillus* testadas quando expostas para diferentes concentrações de NaCl, baseado no teste de Tukey.

^{a - e}: diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) no percentual de sobrevivência entre as cepas de *Lactobacillus* testadas quando expostas para uma mesma concentração de NaCl, baseado no teste de Tukey.

APÊNDICE C

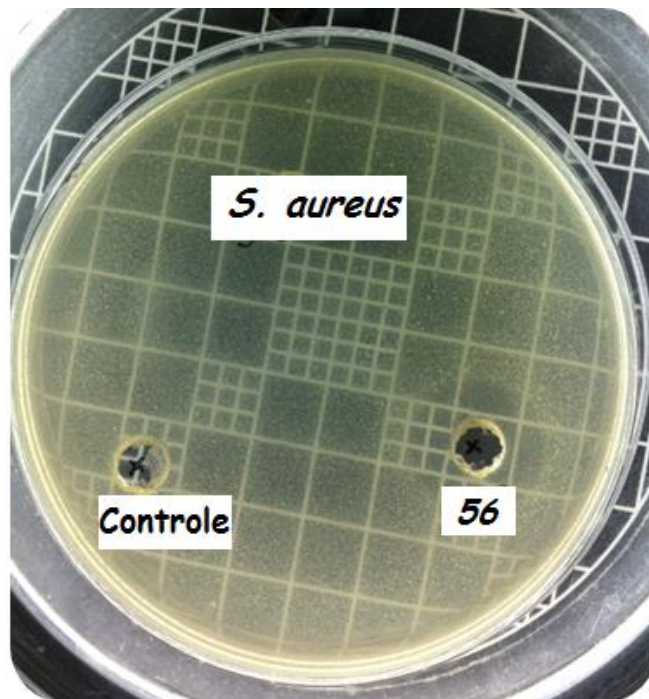
Figura 1 – Atividade hemolítica (γ -hemólise) da cepa *L. fermentum* 139.

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 2 – Atividade antagonista de *L. fermentum* 296 frente a *E. coli* por agar spot test.

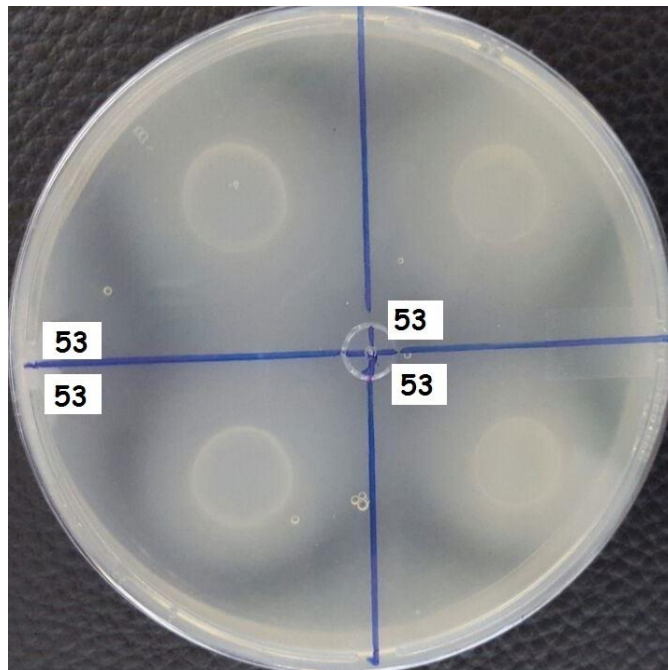
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 3 – Atividade antagonista de *L. fermentum* 56 frente a *S. aureus* por difusão em poço.



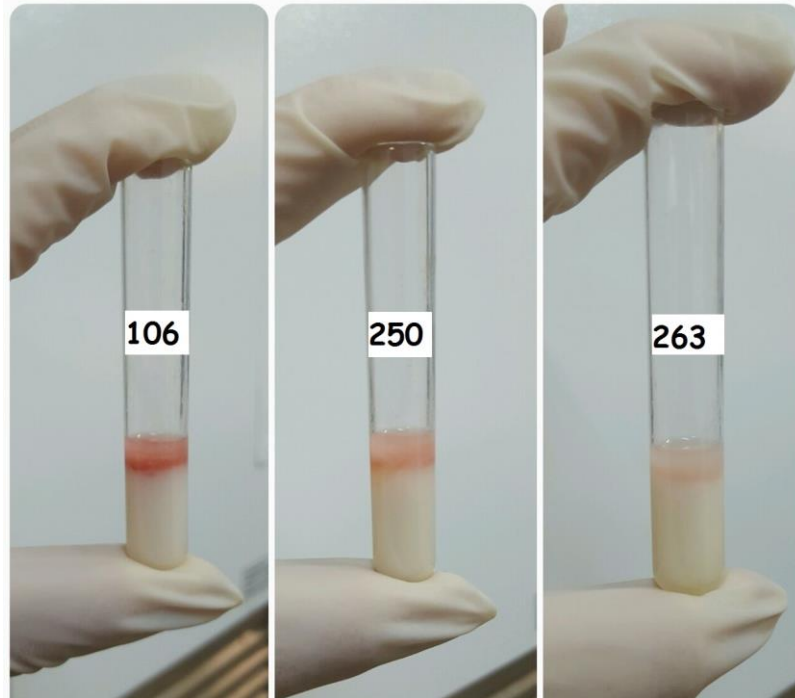
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 4 – Atividade proteolítica da cepa *L. plantarum* 53.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 5 – Produção de diacetil de *L. paracasei* 106 (forte), *L. fermentum* 250 (média) e *L. fermentum* 263 (fraca).



Fonte: Elaborada pelo autor