

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ESTEFÂNIA FERNANDES GARCIA

BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO
PROCESSAMENTO DE FRUTAS: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
PROBIÓTICO E VIABILIDADE TECNOLÓGICA EM SUCOS DE
FRUTAS

JOÃO PESSOA

2017

ESTEFÂNIA FERNANDES GARCIA

BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO
PROCESSAMENTO DE FRUTAS: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
PROBIÓTICO E VIABILIDADE TECNOLÓGICA EM SUCOS DE
FRUTAS

JOÃO PESSOA

2017

ESTEFÂNIA FERNANDES GARCIA

BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO
PROCESSAMENTO DE FRUTAS: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
PROBIÓTICO E VIABILIDADE TECNOLÓGICA EM SUCOS DE
FRUTAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA

2017

Catálogo na publicação
Setor de Catalogação e Classificação

G216b Garcia, Estefânia Fernandes
Bactérias lácticas isoladas de subprodutos do processamento de frutas:
avaliação do potencial probiótico e viabilidade tecnológica em sucos de frutas /
Estefânia Fernandes Garcia. – João Pessoa, 2017.
128 f.: il. -

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza.
Tese (Doutorado) – UFPB/CT/PPGCTA

1. Tecnologia de alimentos. 2. Lactobacillus ssp. 3. Liofilização.
4. Sucos. 5. Controle de qualidade. I. Título.

UFPB/BC

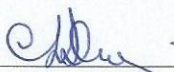
CDU - 664(043)

ESTEFÂNIA FERNANDES GARCIA

BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO
PROCESSAMENTO DE FRUTAS: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
PROBIÓTICO E VIABILIDADE TECNOLÓGICA EM SUCOS DE
FRUTAS

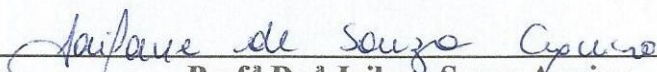
Tese apresentada em 12/06/2017.

BANCA EXAMINADORA



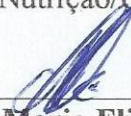
Prof.^a Dr.^a Celso da Silva Dias

Departamento de Ciências Farmacêuticas/ Universidade Federal da Paraíba



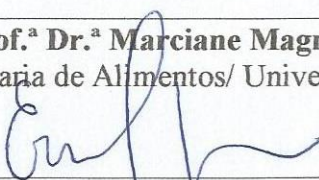
Prof.^a Dr.^a Jailane Souza Aquino

Departamento de Nutrição/ Universidade Federal da Paraíba



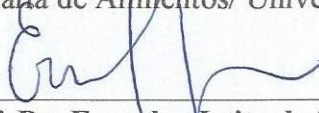
Prof.^a Dr.^a Maria Elieidy Gomes de Oliveira

Departamento de Nutrição/ Universidade Federal da Paraíba



Prof.^a Dr.^a Marciane Magnani

Departamento de Engenharia de Alimentos/ Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Departamento de Nutrição/ Universidade Federal da Paraíba

JOÃO PESSOA

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir vivenciar esta jornada e por me dar sabedoria e perseverança durante esses anos. Por colocar em meu caminho pessoas e oportunidades únicas que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu filho Davi, por me acompanhar nos últimos experimentos e na redação desta tese e por ser o mais novo incentivador da mamãe. Ao marido, amigo e companheiro Alisson, por me incentivar e auxiliar em todos os momentos, por acreditar no meu potencial e por muitas vezes me consolar quando as coisas ficaram difíceis.

Aos meus pais e irmãos, por todo o sacrifício e dedicação durante toda a vida. Hoje mais essa conquista é graças a vocês e para vocês.

Ao Prof. Dr. Evandro Leite de Souza, por me confiar a execução de parte deste projeto e por aceitar me orientar mesmo inicialmente eu trabalhando à 380 km do laboratório. Muito obrigada pela confiança, pela compreensão, pela paciência e por inúmeros ensinamentos. Ao Sr., todo o meu respeito e admiração profissional.

À Prof.^a Dr.^a Marciane Magnani pela dedicação na execução deste projeto desde sua concepção, por sempre que solicitada, me auxiliar durante a execução dos experimentos e redação dos artigos, especialmente nessa reta final, quando Davi estava prestes a vir ao mundo.

À Dr.^a Maria Saarela, por todas as contribuições valiosas ao longo do estudo e por toda a experiência compartilhada com nosso grupo de pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, pelas generosas contribuições para a construção deste trabalho, muito obrigada.

Ao querido amigo Danilo Elias, por todos os ensinamentos sobre microbiologia, por todas as conversas e pela amizade e carinho com que sempre me atendeu.

À Prof.^a Dr.^a Brígida Luckwu, pela valiosa parceria na identificação molecular das cepas, por pacientemente me ensinar e acompanhar durante estes experimentos e pela amizade construída durante esta etapa.

Aos professores e colaboradores: Prof.^a Dr.^a Renata Picão, Prof. Dr. Octávio Luiz Franco, Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior, Prof.^a Dr.^a Marta Suely Madruga, Prof. Dr. Marcos dos Santos Lima, Heloisa Helena e Kleber Oliveira, pelas importantes contribuições para o desenvolvimento deste estudo.

À Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia da Conceição, por sempre me receber de braços abertos no laboratório e estar prontamente disposta a ajudar em todos os momentos, por pacientemente me atender e em quaisquer circunstâncias me oferecer um sorriso.

A Universidade Federal da Paraíba, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de cursar o doutorado. Agradeço também a todos os professores membros do programa, pelos ensinamentos concedidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.

Às irmãs que ganhei da vida, Ingrid e Elieidy, pelo incentivo desde a inscrição no programa de doutorado, pelos inúmeros ensinamentos e discussões sobre a tese, mas acima de tudo, pelo apoio, amizade, amor, carinho, cuidado e atenção que vocês têm tido comigo, sinto-me amiga, irmã e às vezes filha. Serei eternamente grata a vocês por tudo, principalmente por terem se sacrificado tanto para que eu pudesse estar na UFPB hoje.

À Winnie, que por meio da iniciação científica iniciou seu trabalho conosco e que tanto colaborou durante os experimentos, especialmente quando eu ainda trabalhava na UFCG. Além de uma ótima aluna e colega de laboratório, tornou-se uma amiga querida.

À Sônia, Amanda, Thais, Caroline, Kataryne, Jossana, Raquel, Daniel, Nayara, Jéssica, Rayssa, Geane, Isabela, Djean, Thatyane, Whyara, Eduardo e a todos os outros

colegas que passaram pelo Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos e que participaram de alguma forma dos ensaios e compartilharam momentos de alegria, aflição e de geração de conhecimento.

Às colegas da pós-graduação, Sinara, Jéssica, Amanda, Daline, Inês, Isabele, Narciza, Taliana, Fábio, Íris e Valquiria, por todos os momentos compartilhados, pela ajuda durante os experimentos e pela amizade.

Aos meus colegas de trabalho da UFCG pelo apoio, especialmente à amiga Prof.^a Dr.^a Mônica Tejo, pela amizade e por todo o carinho com que sempre me recebeu e me escutou.

Aos meus colegas da UFPB, especialmente à Prof.^a Noádia Rodrigues, que por vezes me socorreu nas atividades da docência para que eu pudesse ir ao laboratório desenvolver os experimentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

O estudo do potencial de diferentes espécies de bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de matrizes vegetais tem se intensificado nos últimos anos. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar BAL de subprodutos do processamento de polpas de fruta e analisar o potencial probiótico e tecnológico em sucos de frutas. O trabalho foi subdividido em três etapas: inicialmente foram realizadas coletas de subprodutos do processamento de abacaxi, manga, acerola, caju, graviola, morango e goiaba para isolamento de cepas de BAL. As cepas isoladas foram identificadas quanto ao gênero e/ou espécie; em seguida, cepas representantes de espécies de *Lactobacillus* foram submetidas a testes de avaliação do potencial probiótico, posteriormente cinco cepas, uma de cada espécie, foram liofilizadas e avaliadas quanto à manutenção da viabilidade durante o armazenamento sob congelamento, quando inseridas em sucos comerciais (uva, maçã e laranja) e quando expostas a condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI) nos sucos. Ainda, o impacto da incorporação das cepas liofilizadas nos aspectos de qualidade físico-química e microbiológica dos sucos foi avaliado. Foram identificadas cepas pertencentes aos gêneros *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e, majoritariamente, *Lactobacillus*. Dentre os lactobacilos, a identificação realizada utilizando as técnicas de MALDI-TOF e 16S rRNA apresentou eficácia de 86% e 100%, respectivamente. As espécies de lactobacilos identificadas foram: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. nagelii* e *L. brevis*. Quanto à avaliação do potencial probiótico, as cepas testadas apresentaram redução na contagem em $\text{pH} \leq 3$, porém a viabilidade não foi afetada quando expostas a pH 5 e 7,2; assim como, em diferentes concentrações de sais biliares (1, 2 e 3%). As cepas também exibiram atividade inibitória contra bactérias patogênicas, e variável perfil de resistência a antibióticos. As cepas testadas apresentaram padrão de crescimento similar quando cultivadas em caldo de Man, Rogosa & Sharpe (MRS) e em meio de cultura comestível geral. As cepas liofilizadas apresentaram viabilidade semelhante até 30 dias de armazenamento sob congelamento. Após 120 dias de armazenamento, apenas *L. pentosus* 129 apresentou contagem $< 2 \log \text{ UFC/mL}$, enquanto as demais cepas apresentaram contagens $\geq 4 \log \text{ UFC/mL}$. Quando inseridas em sucos, as cepas apresentaram contagem $> 4 \log \text{ UFC/mL}$ mesmo após 21 dias de armazenamento sob refrigeração. Os parâmetros físico-químicos (pH , acidez, sólidos solúveis totais, cor e viscosidade) estudados não variaram até 14 dias de armazenamento. A capacidade de tolerar as condições simuladas do TGI variou entre as cepas testadas, porém *L. fermentum* 111 e *L. pentosus* 129 apresentaram-se como as cepas mais sensíveis a essa exposição. O suco de maçã exerceu maior efeito protetor frente às condições simuladas do TGI. Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar que cepas de diferentes espécies de lactobacilos isoladas de subprodutos do processamento de frutas possuem potencial probiótico, bem como capacidade de manter a viabilidade após liofilização e incorporação em sucos de fruta comerciais.

Palavras-chave: *Lactobacillus* spp., liofilização, sucos, controle de qualidade.

ABSTRACT

Studies focusing on the potential of different species of acid-lactic bacteria (LAB) isolated from vegetables matrices has intensified in recent years. The aim of this research was to isolate and identify LAB from the by-products of fruit pulp processing and to analyze the probiotic and technological potential in fruit juices. The research was subdivided into three stages: initially, by-products were collected from the processing of pineapple, mango, acerola, cashew, soursoup, strawberry and guava for isolation of LAB strains. Isolated strains were identified for genus and/or species; *Lactobacillus* species were submitted to probiotic potential evaluation tests. Five strains of each species were then lyophilized and evaluated for maintenance of viability during storage under freezing when placed in commercial juices (grapes, apple and orange) and when exposed gastrointestinal tract (GIT) simulated conditions in juices. Also, the impact of the incorporation of the lyophilized strains on the physical-chemical and microbiological quality aspects of the juices was analyzed. Strains belonging to the genus *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* and, mainly, *Lactobacillus* were identified. Among the lactobacilli, the identification performed using the MALDI-TOF and 16S rRNA techniques showed efficacy of 86% and 100%, respectively. The identified species of lactobacilli were *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. nagelii* and *L. brevis*. Regarding the evaluation of the probiotic potential, the tested cultures showed a reduction in pH ≤ 3 , but viability was not affected when exposed to pH 5 and 7.2; as well as in different concentrations of bile salts (1, 2 and 3%). The strains also exhibited inhibitory activity against pathogenic bacteria, and a variable profile of antibiotic resistance. The cultures showed similar growth pattern when cultivated in Man, Rogosa & Sharpe (MRS) broth and in general edible culture medium (GEM). The lyophilized cultures showed similar viability up to 30 days of freezing. After 120 days of storage, only *L. pentosus* 129 showed a count of <2 log CFU/mL, while the other strains had counts ≥ 4 log CFU/mL. When added to juices, the cultures showed a count > 4 log CFU/mL even after 21 days of storage under refrigeration. The physical-chemical parameters (pH, acidity, total soluble solids, color and viscosity) studied did not vary until 14 days of storage. The capacity to tolerate GIT simulated conditions varied among the observed strains, having *L. fermentum* 111 and *L. pentosus* 129 been identified as the most sensitive to the exposure. The apple juice showed the greatest protective effect against GIT simulated conditions. Based on the results obtained, it was possible to verify that strains of different species of lactobacilli isolated from probiotic potential food processing byproducts, as well as the ability to maintain viability after lyophilization and incorporation into commercial fruit juices.

Key words: *Lactobacillus* spp., lyophilization, juice, quality control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Mecanismos de atividade de microrganismos probióticos no intestino.....	24
Quadro 1	- Identificação dos isolados selecionados para liofilização e inserção em sucos de fruta.....	39
Quadro 2	- Condições simuladas do TGI.....	46

ARTIGO 2

Figure 1	- Average contents (n = 6) of organic acids (citric, malic, lactic, succinic, acetic and tartaric acid; g/L) in apple (A, B, C, D), orange (E, F, G, H) and grape (I, J, L, M) juices with or without added freeze-dried cells of <i>L. plantarum</i> 49 and <i>L. paracasei</i> 108 on day 1 (■) and 14 (▨) of the refrigerated storage ($4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$). C: control juice without added freeze-dried cells; Lpl 49: juice with freeze-dried cells of <i>L. plantarum</i> 49; and Lpc 108, juice with freeze-dried cells of <i>L. paracasei</i> 108. The error bars represent the standard deviations. Different small letters for the same fruit juice with or without each of the added freeze-dried strains denotes a difference ($p \leq 0.05$) among the values, based on the Tukey's test; an asterisk denotes difference between the data obtained for the same fruit juice with or without the added freeze-dried strain on day 1 and 14 of storage ($p \leq 0.05$), based on Student's t test.....	122
Figure 2	- Average contents (n = 6) of glucose and fructose sugars (g/L) in apple (A; B), orange (C; D) and grape (E; F) juices with or without freeze-dried cells of <i>L. plantarum</i> 49 and <i>L. paracasei</i> 108 on day 1 (■) and 14 (▨) of refrigerated storage ($4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$). C: Control juice, without added freeze-dried cells; Lpl 49: juice with freeze-dried cells of <i>L. plantarum</i> 49; and Lpc 108: juice with freeze-dried	

cells of *L. paracasei* 108. The error bars represent the standard deviations. Different small letters for the same fruit juice with or without each of the added freeze-dried strains denotes a difference ($p \leq 0.05$) among the values, based on the Tukey's test; an asterisk denotes a difference between the data obtained for the same fruit juice with or without the added freeze-dried strain on days 1 14 of storage ($p \leq 0.05$), based on Student's t test..... 123

Figure 3 - Survival rates (averages $\pm$ standard deviations; n = 6) of freeze-dried cells of *L. plantarum* 49 (A), *L. brevis* 59 (B), *L. paracasei* 108 (C), *L. fermentum* 111 (D) and *L. pentosus* 129 (E) in apple (■), orange (▲) and grape (●) juices and in MRS broth (✱) during *in vitro* digestion. The error bars represent the standard deviations. Survival rates: N/N0; where N is the viable count (log cfu/mL) in fruit juices or MRS broth containing the freeze-dried cells at each monitored step of the *in vitro* digestion, and N0 is the viable count in the same fruit juices or MRS broth immediately after the incorporation of the freeze-dried cells..... 124

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1	Identification of lactic acid bacteria isolates from different fruit pulp processing byproducts (total number of isolates from each source, technique applied for identification and number of isolates identified by each applied identification technique).....	89
Table 2	Number of identified lactic acid species from fruit pulp processing byproducts according to each applied identification technique and congruency of identification between the applied identification techniques..	90
Table 3	Viable cell counts (n = 3, mean values $\pm$ standard deviation; log CFU/g) of different lactobacilli strains from pulp fruit processing byproducts when challenged with different pH values and bile salt concentrations for different exposure time periods and antagonistic activities, as expressed in diameter (mm) of growth inhibition zones ($\pm$ standard deviation), toward pathogenic bacteria as measured by spot agar and well diffusion assays.....	91
Table 4	MIC of different antibiotics against different lactobacilli strains from pulp fruit processing byproducts.....	92
Table 5	Viable cell counts (n = 3, mean values $\pm$ standard deviation; log CFU/g) of lactobacilli isolates from pulp fruit byproducts when cultivated in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) and in general edible medium (GEM) broths at low-scale (200 mL) and medium-scale (2000 mL) volumes at 37 °C during 48 h (initial viable cell counts of approx. 7 log CFU/mL).....	93

ARTIGO 2

Table 1	Survival rates (averages $\pm$ standard deviations; n = 6) of freeze-dried cells of <i>L. plantarum</i> 49, <i>L. brevis</i> 59, <i>L. paracasei</i> 108, <i>L. fermentum</i> 111 and <i>L. pentosus</i> 129 in apple, orange and grape juices during 21 days of	
----------------	--	--

	refrigerated storage ($4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$).....	125
Table S1	Values of physicochemical parameters (average $\pm$ standard deviation; n = 6) of apple, orange and grape juices with and without added freeze-dried cells of <i>L. plantarum</i> 49, <i>L. brevis</i> 59, <i>L. paracasei</i> 108, <i>L. fermentum</i> 111 and <i>L. pentosus</i> 129 during 21 days of refrigerated storage ($4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$)...	126

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	19
2.2 PROBIÓTICOS COMO PARTE DA MICROBIOTA INTESTINAL E SEU PAPEL NA SAÚDE DOS INDIVÍDUOS.....	21
2.3 FRUTAS E SEUS SUBPRODUTOS COMO FONTE DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS PROBIÓTICAS.....	26
2.4 CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E SUA INSERÇÃO EM PRODUTOS DE FRUTAS.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 LOCAIS DE EXECUÇÃO.....	32
3.2 MATERIAL.....	32
3.3 MÉTODOS.....	33
3.3.1 Isolamento e Caracterização.....	33
3.3.2 Identificação pela técnica de MALDI-TOF – “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight”.....	33
3.3.3 Identificação molecular dos isolados.....	35
3.3.4 Avaliação do potencial probiótico.....	36
3.3.4.1 Tolerância a diferentes valores de pH.....	36
3.3.4.2 Tolerância a diferentes concentrações de sais de bile.....	36
3.3.4.3 Antagonismo frente a bactérias patogênicas.....	37
3.3.4.4 Resistência a antibióticos.....	38
3.3.5 Determinação da viabilidade de lactobacilos isolados de resíduos de polpa de fruta em Caldo General Edible Medium (GEM) e de Man, Rogosa, Sharpe (MRS).....	39
3.3.6 Liofilização e avaliação da viabilidade das cepas durante armazenamento congelado (-18 °C).....	40
3.3.7 Inserção de cepas de lactobacilos liofilizadas em sucos de fruta.....	41
3.3.8 Aspectos de qualidade de sucos de fruta adicionados de lactobacilos liofilizados.....	42

3.3.8.1 Acidez titulável.....	42
3.3.8.2 pH.....	42
3.3.8.3 Sólidos solúveis totais.....	42
3.3.8.4 Viscosidade.....	43
3.3.8.5 Cor.....	43
3.3.8.6 Ácidos orgânicos e açúcares.....	43
3.3.9 Viabilidade dos lactobacilos liofilizados inseridos em sucos de fruta...	44
3.3.10 Sobrevivência das cepas em condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI).....	45
3.3.11 Análises estatísticas.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
4 RESULTADOS.....	58
4.1 ARTIGO 1: IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FRUIT PULP PROCESSING BYPRODUCTS AND POTENTIAL PROBIOTIC PROPERTIES OF SELECTED <i>LACTOBACILLUS</i> STRAINS.....	58
4.2 ARTIGO 2: THE PERFORMANCE OF FIVE POTENTIALLY PROBIOTIC FRUIT-DERIVED FREEZE-DRIED <i>LACTOBACILLUS</i> STRAINS IN APPLE, ORANGE AND GRAPE JUICES.....	94
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	128

1 INTRODUÇÃO

O crescente reconhecimento por parte dos consumidores da existência de relação positiva entre dieta e saúde tem refletido em mudanças no mercado de alimentos, com incremento particular no de alimentos funcionais (CHAMPAGNE et al., 2011; TRIPATHI; GIRI, 2014). Um dos grandes segmentos deste mercado compreende os alimentos com probióticos, prebióticos ou ambos componentes, os quais são denominados alimentos simbióticos. Os probióticos são definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014). Estes microrganismos têm sido utilizados adicionados em alimentos devido a existência de evidências científicas de que a manutenção de uma microbiota intestinal saudável pode exercer efeitos protetores frente a distúrbios do trato gastrointestinal (TGI), incluindo infecções e síndromes inflamatórias do intestino (OLVEIRA; GONZALES-MOLERO, 2016; REID, 2016).

Probióticos empregados na formulação de alimentos são isolados, principalmente, do intestino de humanos e animais, assim como de alimentos lácteos fermentados (AMARA; SHIBL, 2015). No entanto, tem sido reportado que bactérias ácido lácticas (BAL) habitantes de frutas e vegetais, especialmente aquelas submetidas a processos de fermentação, possuem potencial probiótico, tendo destaque para os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactococcus* (DI CAGNO et al., 2010; BAUTISTA-GALLEGO et al., 2013; PERES et al., 2012; DI CAGNO et al., 2013). A base teórica para a seleção desses microrganismos para uso em alimentos inclui aspectos de segurança, como por exemplo, não ser patogênico e não transmitir genes de resistência a antibióticos; aspectos de funcionalidade, como tolerância ao suco gástrico humano e à bile, aderência à superfície epitelial, persistência no trato gastrointestinal e atividade antagônica contra patógenos; e aspectos tecnológicos, a citar a capacidade de manutenção da viabilidade durante o processamento e estabilidade no produto durante o armazenamento (GREGORET et al., 2013; SAARELA et al., 2000).

A principal fonte de isolamento de cepas probióticas comerciais é o TGI humano (DI CAGNO et al., 2013), porém nem sempre essas cepas adaptam-se bem às matrizes vegetais, o que gera um entrave à sua aplicação em sucos. BAL que fazem parte da microbiota de frutas têm sido investigadas quanto ao potencial probiótico e tecnológico com vistas a possibilitar sua aplicação em frutas e derivados processados (DI CAGNO et al., 2008, 2009). A maior

resistência dessas cepas à matriz vegetal pode estar associada às próprias condições intrínsecas da sua matriz de origem. Segundo Martins et al. (2013), a parede celular de BAL naturalmente presentes em plantas é mais resistente, permitindo maior tolerância à exposição a condições de estresse. Além disso, a capacidade de suportarem as condições adversas do TGI pode também estar associada às particularidades de seu próprio habitat vegetal que apresenta características químicas que se assemelham em alguns aspectos ao TGI, como o ambiente ácido e a elevada concentração de nutrientes não digeríveis (e.g., fibras, inulina e frutooligossacarídeos) (VITALI et al., 2012).

Concomitante ao aumento na busca por alimentos probióticos, evolui o aumento do consumo de frutas, principalmente em decorrência do apelo em função de seu valor nutritivo e dos possíveis efeitos benéficos sobre a saúde dos indivíduos. No entanto, durante o processamento de sucos, polpas e produtos minimamente processados normalmente é gerado grande volume de subprodutos, os quais são, na maioria das vezes, desprezados pelas indústrias. Estima-se, que do total de frutas processadas, aproximadamente 40% seja descartado como subprodutos agroindustriais na forma de cascas, caroços, sementes e restos de polpa (LOUSADA JÚNIOR et al., 2006). O uso de resíduos agroindustriais deve ser direcionado para o desenvolvimento de novos produtos atraentes com propriedades bioativas e redução do impacto causado pela acumulação no meio ambiente (REQUE et al., 2014).

Dentre as diferentes matrizes alimentares, os sucos de fruta têm se destacado quanto ao seu potencial em atuar como veículos de microrganismos probióticos, sendo bem posicionados no mercado de alimentos em decorrência do apelo de promoção de saúde aos consumidores e da satisfatória frequência de consumo por grande parcela da população pertencente aos diferentes grupos etários (PERES et al., 2012). Considerando que grande parte dos produtos probióticos disponíveis no mercado envolvem matrizes lácteas, como iogurtes, queijos e leites fermentados, a incorporação destes microrganismos em sucos poderia representar um fator impulsionador no desenvolvimento de novos alimentos probióticos utilizando matrizes vegetais (PEREIRA et al., 2011). Quando inseridos nos alimentos, microrganismos probióticos são geralmente adicionados na forma liofilizada, o que facilita o processo industrial e armazenamento por longos períodos. No entanto, a secagem expõe o microrganismo a condições de estresse, o que implica na necessidade de avaliação do seu impacto sobre a viabilidade e funcionalidade das cepas liofilizadas quando inseridas em produtos alimentícios (SAARELA et al., 2006a).

Considerando tais aspectos, este estudo teve como objetivos: i) isolar e identificar cepas de BAL de frutas e subprodutos do processamento de polpas de fruta; ii) avaliar o potencial probiótico das cepas isoladas; e iii) verificar o potencial tecnológico cepas selecionadas quando inseridas em diferentes sucos de frutas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

BAL compõem um grupo filogeneticamente muito heterogêneo (BURGAIN et al., 2014), constituído por diversos gêneros. São bactérias Gram positivas, apresentam morfologia de cocos ou bacilos não formadores de esporos (KLAENHAMMER et al., 2002), podem multiplicar-se em temperaturas de 5 a 45 °C e em condições ótimas de pH entre 5.5 a 6.5 (VODNAR et al., 2010). Ainda, são caracterizadas como aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, oxidase e catalase negativas, não redutoras de nitratos a nitritos e incapazes de utilizar lactato (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As espécies que fazem parte desse grupo são nutricionalmente exigentes e requerem a disponibilidade de moléculas orgânicas complexas (BURGAIN et al., 2014), incluindo aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, vitaminas, sais minerais, ácidos graxos e carboidratos (VODNAR et al., 2010). BAL podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com seu metabolismo, a saber: homofermentativas, as quais metabolizam glicose convertendo-a mais facilmente em ácido láctico; e heterofermentativas, as quais além do ácido láctico formam outros compostos como dióxido de carbono, ácido acético e etanol a partir da fermentação da glicose, bem como compostos aromáticos, como aldeído e diacetil (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

O grupo de BAL inclui os gêneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Missococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (RUAS-MADIEDO et al., 2012). Dentre estes, os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus* são os mais comumente utilizados como cultura “starter” na fermentação de vegetais, produtos lácteos e cárneos (HLADÍKOVÁ et al., 2012; NIETO-LOZANO et al., 2010).

O grupo das BAL possui o “status” GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros), sendo amplamente utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica para consumo humano (FDA, 2010). São consideradas como um dos mais relevantes agentes de controle biológico (JENSEN et al., 2002), em soma às suas propriedades fermentativas e de agregação de sabor que ampliam o seu uso na indústria de alimentos. Os produtos do metabolismo secundário das

BAL estão diretamente associados aos seus efeitos positivos no hospedeiro e nos alimentos. A síntese de ácidos orgânicos, como o láctico, acético e propiônico (PIENIZ et al., 2014), promove a redução do pH e exerce efeito inibitório contra bactérias patogênicas e deterioradoras em alimentos, além de modificar o sabor e aroma, possibilitando a produção de alimentos sensorialmente atrativos (GANZLE; LOPONEN; GOBBETTI, 2008)

Além da síntese de ácidos orgânicos, a produção de bacteriocinas por BAL pode exercer importante efeito inibitório frente a microrganismos, com impactos positivos na preservação e segurança de alimentos. As bacteriocinas são peptídeos de alta especificidade na inibição de algumas bactérias (CROWLEY; MAHONYA; SINDEREN, 2013; SALVUCCI; LEBLANC; PÉREZ, 2016) e são capazes de exercer este efeito mesmo em baixas concentrações, além de apresentarem baixa toxicidade e serem digeridas pelas proteases intestinais (WORAPRAYOTE et al., 2016).

Outra característica do metabolismo das BAL que possibilita a sua aplicação em alimentos é a capacidade de se multiplicarem na presença de concentrações elevadas de NaCl, o que é especialmente importante para produtos fermentados, como queijos (OLIVEIRA et al., 2014; SONGISEPP et al., 2011) e derivados cárneos embutidos (SIDIRA et al., 2014; SIDIRA et al., 2016).

A ação fermentativa e, consequentemente, de preservação das BAL tem sido explorada em vários estudos, sendo identificados os diferentes representantes deste grupo responsáveis pelas alterações químicas promovidas durante o processo de fermentação (ANGMO et al., 2016; DI CAGNO et al., 2011; GARCIA et al., 2016; GARCIA-RUÍZ et al., 2014; VITALI et al., 2012). Em muitos dos alimentos fermentados por BAL, especialmente frutas e vegetais, a microbiota natural, quando em condições favoráveis de anaerobiose, atividade de água, concentração de sal e temperatura, promove a fermentação espontânea (DI CAGNO et al., 2013). Entretanto, o processo fermentativo desordenado pode promover falta de homogeneidade dos produtos elaborados, inadequada inibição de microrganismos patogênicos e deterioradores, além de alterações sensoriais e nutricionais indesejáveis (DI CAGNO et al., 2013). Em contrapartida, alimentos elaborados com inserção de culturas iniciadoras e uso de processo de fermentação controlado apresentam uniformidade nas características de sabor, odor e textura, além de maior eficácia no controle de patógenos e do processo de deterioração.

O papel tecnológico e de preservação das BAL nos alimentos tem sido amplamente explorado pela indústria, porém nas ultimas décadas o potencial probiótico desses microrganismos tem aberto novos horizontes nas áreas das ciências médicas e biotecnologia aplicada a alimentos. A importância industrial das BAL tem impulsionado os avanços científicos em áreas de investigação, tais como microbiologia, fisiologia, genética e mais recentemente genômica (JENSEN et al., 2012).

2.2 PROBIÓTICOS COMO PARTE DA MICROBIOTA INTESTINAL E SEU PAPEL NA SAÚDE DOS INDIVÍDUOS

Antes de discutir o papel das BAL como probióticos, torna-se importante destacar que no homem, estas bactérias estão inseridas em um microbioma formado por diversas espécies microbianas em interação com o organismo. O termo microbioma foi sugerido por Joshua Lederberg, ganhador do prêmio Nobel de medicina em 1958, para descrever todo o genoma dos microrganismos autóctones do corpo humano (HOOPER 2001). A microbiota consiste das células microbianas que se hospedam no organismo humano, especialmente no intestino (URSELL et al., 2012). A microbiota está em estreito contato com a mucosa intestinal, ocupando aproximadamente 250 a 400 m². Os microrganismos que constituem a microbiota intestinal são desigualmente distribuídos ao longo do trato digestivo. Uma população menor que 10³ coloniza o estômago e duodeno, enquanto no intestino grosso essa população varia de 10¹⁰ a 10¹⁴, com grande concentração de microrganismos anaeróbicos e principal atividade microbiana na porção distal (AURELI et al., 2011; SUAU et al., 1999).

Aproximadamente 60 espécies bacterianas apresentam-se em comum nos humanos, porém a composição completa da microbiota de cada indivíduo apresenta aspectos diferenciais. Essa microbiota é composta, principalmente, por dois filos bacterianos, os Bacteroides e os Firmicutes, os quais representam mais de 90% dos grupos filogenéticos da porção distal do intestino (AURELI et al., 2011).

As bactérias da microbiota intestinal benéfica estabelecem uma relação de simbiose e comensalidade com o organismo, o que promove uma ampla interação com os enterócitos. A mudança na composição das espécies que compõem essa microbiota ocorre com o avanço da idade, estado de saúde e composição da dieta. Essa interação resulta em propriedades benéficas ao hospedeiro, tais como a formação de barreira intestinal que dificulta o acesso de

patógenos aos enterócitos, produção de ácidos graxos de cadeia curta, produção de vitaminas, interação com o sistema imune e degradação de xenobióticos (AURELI et al., 2011; HOOPER; GORDON, 2001; JONES; MARCHESI, 2007).

Apesar dos efeitos positivos exercidos pela microbiota comensal à saúde humana, é comum identificar confusão entre esses e os microrganismos probióticos. Embora microrganismos comensais no intestino sejam frequentemente caracterizados como cepas potencialmente probióticas, até que estas sejam isoladas, caracterizadas e seus efeitos cepa-específicos sejam demonstrados à saúde humana, essas bactérias comensais não podem ser denominadas probióticas (HILL et al., 2014).

O conceito de probióticos foi definido por especialistas da WHO (World Health Organization) e pela FAO (Food and Agriculture Association of United Nations) em 2002 como sendo “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Esse conceito tem sido aceito e utilizado mundialmente por pesquisadores, entidades governamentais e de segurança de alimentos (EFSA, 2012; FAO/WHO, 2002; FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND, 2013; HEALTH CANADA, 2009; HILL et al., 2014).

A questão em torno da eficácia dos probióticos está associada à comprovação de efeito à saúde por determinada cepa, não podendo se generalizar certos efeitos a todos os membros de uma espécie ou gênero. Cepas bacterianas relacionadas podem diferir consideravelmente em seu genótipo e fenótipo (AZAIS-BRAESCO et al., 2010; SANDERS, 2008). Enquanto membros de uma mesma espécie podem apresentar resultados clínicos diferentes, gêneros distintos podem desempenhar papel semelhante na saúde humana (AZAIS-BRAESCO et al., 2010).

Em sua revisão sobre os efeitos à saúde promovidos por microrganismos probióticos, Hill et al. (2014) afirmam que, quanto à manutenção de um sistema digestivo saudável (produção de ácidos graxos de cadeia curta, regulação do trânsito intestinal, exclusão competitiva de patógenos e aumento do volume dos enterócitos), um grande número de cepas probióticas podem ser agrupadas quanto a capacidade de fornecer essa alegação, porém outros efeitos são específicos de determinadas espécies (síntese de vitaminas, antagonismo direto à patógenos, metabolização de sais biliares, atividade enzimática, neutralização de carcinógenos e reforço da barreira intestinal) ou ainda de determinadas cepas (efeitos neurológicos, imunológicos, endócrinos e produção de compostos bioativos específicos).

A legislação brasileira (BRASIL, 2016) atesta essa declaração dos membros do ACIPP (HILL et al., 2014), quando afirma que as alegações de saúde reivindicadas para determinada cepa deverão ser comprovadas caso a caso, com estudos que claramente confirmem que determinada dose viável de células quando ingeridas irão fornecer os efeitos alegados.

O conceito da FAO/WHO (2002) é claro quando afirma que os microrganismos “quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”, porém não estabelece exatamente qual seria essa dose. Alguns pesquisadores afirmam que uma concentração mínima de 10^5 - 10^6 UFC/g ou mL ou ainda 10^7 UFC/g ou mL (DING; SHAH, 2008; NUALKAELKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011) seria suficiente para fornecer tais benefícios. No entanto, a dose de probióticos recomendada deve basear-se em estudos com seres humanos, onde a eficácia de determinada dose está associada aos efeitos à saúde. Por exemplo, Sanders (2008) cita o estudo de Whorwell; Altringer e Morel, (2006) onde os autores afirmam que a eficácia de *Bifidobacterium infantis* 35264 em mulheres com síndrome do intestino irritável ocorre quando uma dose de 10^8 UFC/dia é consumida, no entanto a dose recomendada pela VSL#3 (VSL Pharmaceuticals) é de $1,8 \times 10^{12}$ UFC/dia. O autor afirma ainda que outros fatores devem ser observados quando se avalia a eficácia de um produto probiótico, tais como fase de multiplicação do microrganismo, tecnologia de preservação e interação com ingredientes da matriz, os quais podem influenciar no efeito estabelecido pelo produto.

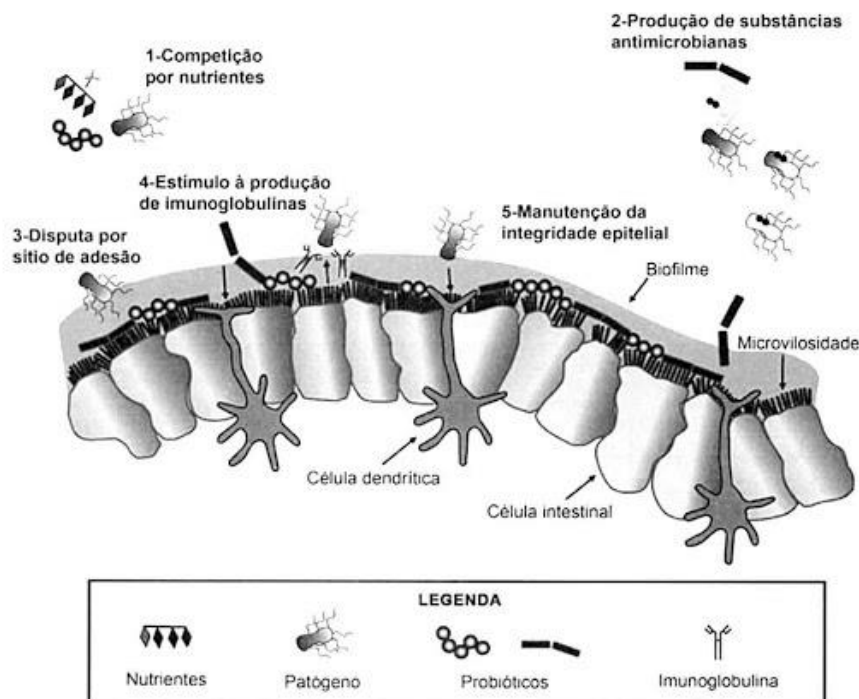
Dessa forma, a avaliação de um produto probiótico para ser consumido pela população deverá atender aos critérios delimitados pela FAO/WHO (2002), a saber: identificação genotípica e fenotípica com determinação de gênero, espécie e subtipo; depósito em coleção internacional de culturas; avaliação de segurança; caracterização funcional *in vitro* e em animais; validação dos benefícios à saúde em humanos, incluindo determinação da quantidade do microrganismo necessária para proporcionar tais efeitos, informações na rotulagem do produto a respeito da identificação da cepa utilizada (gênero, espécie), número mínimo de células viáveis durante o armazenamento e alegação da eficácia do produto.

Já é bem estabelecida a necessidade de comprovação da eficácia de microrganismos probióticos que poderão ser utilizados por humanos, sejam veiculados por uma matriz alimentar ou utilizados como fármaco. Algumas espécies de probióticos, já com potencial comprovado, apresentam diversas aplicações não apenas como reguladores da saúde

intestinal, mas também no tratamento de algumas doenças. Em nível intestinal, a presença e colonização por essas cepas promove uma série de benefícios (Figura 1), a citar: funcionam como uma espécie de barreira contra colonização por patógenos, modulam a resposta imune da mucosa intestinal, produzem substâncias antimicrobianas e alteram a composição da microbiota, o que direta e indiretamente modifica o metabolismo humano de maneira positiva (EWASCHUK; DIELEMAN, 2006).

Num extenso estudo de revisão, Aureli et al. (2011) afirmam que a ingestão de algumas cepas probióticas contribui para a prevenção de doenças infecciosas e diarreia em crianças, e que determinadas cepas melhoram distúrbios no funcionamento do intestino, reduzem a frequência e gravidade da enterocolite necrosante em prematuros e podem ser utilizados para acelerar a remissão clínica em doença inflamatória intestinal. Afirmam ainda, que alguns probióticos, provavelmente pela estimulação de vias imunológicas não específicas, parecem reduzir a duração e/ou a gravidade das infecções virais sazonais.

Figura 1 – Mecanismos de atividade de microrganismos probióticos no intestino (adaptado de MCALLISTER et al., 2011).



Rijkers et al. (2011) assim como Olveira e Gonzales-Molero (2016) também reportam que estudos de meta-análise têm demonstrado o efeito de probióticos na prevenção e tratamento da diarreia associada à ingestão de antibiótico e enterocolite necrosante, bem como que o consumo de probióticos pode estimular vários componentes do sistema imunológico.

Harb et al. (2013), em estudos em ratos na fase neonatal, comentam que a administração de *Lactobacillus rhamnosus* GG resultou em efeitos protetores sobre a resposta inflamatória alérgica. Cuello-Garcia et al. (2015), em estudo sobre o uso de probióticos para a prevenção de alergias, especialmente durante a gestação e lactação, verificaram relação entre a suplementação de probióticos e a redução do risco de eczema, incluindo eczema atópico em lactentes. Atualmente, o consenso tem sido de que ainda não existem evidências suficientes que comprovem que a suplementação de probióticos reduz ou não o risco de alergias (AURELI et al., 2011; CUELLO-GARCIA et al., 2015).

Alguns estudos (LI et al., 2014; SADRZADEH-YEGANEH et al., 2010; ZHANG et al., 2017) afirmam que a administração de cepas probióticas pode modular o metabolismo lipídico e exercer ação hipolipemiante, podendo inclusive ser utilizado no tratamento da obesidade (ZHANG et al., 2017). Rouxinol-Dias et al. (2016) em revisão sistemática sobre uso de probióticos e ganho de peso reportam que o efeito dos microrganismos probióticos é cepa específico. Assim, algumas cepas, como *Lactobacillus rhamnosus* GGMC, têm sido associadas a efeito positivo na perda de peso em humanos, enquanto outras cepas podem estar associadas a um ganho de peso menos nocivo à saúde em razão de exercerem influência no sistema imunológico, no estado inflamatório e nos níveis de leptina. De maneira geral, são necessários mais estudos sobre a relação entre probióticos e ganho de peso, entretanto existem indícios do uso dessa terapia tanto para obesidade quanto para desnutrição (LEE et al., 2014; ROUXINOL-DIAS et al. 2016).

2.3 FRUTAS E SEUS SUBPRODUTOS COMO FONTES DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROBIÓTICAS

Diversas espécies de BAL têm sido isoladas de frutas e seus subprodutos agroindustriais, tais como: *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*, *L. nagelli*, *L. fermentum*, *L. paraplantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc citreum*, *L. lactis* em abacaxi e seus subprodutos; *L. plantarum* e *L. brevis* em acerola e seus

subprodutos; *L. paracasei* em graviola e seus subprodutos; *L. pentosus*, *L. c. mesenteroides*, *Pediococcus pentosacus* em manga e seus subprodutos (GARCIA et al., 2016); *L. curvatus* em pimentas (DI CAGNO et al., 2009); *L. rossiae* em abacaxi (DI CAGNO et al., 2010); *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* em tomates (DI CAGNO et al., 2008) e *L. pentosus*, *L. mesenteroides*, *L. paramesenteroides*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. paracasei* em olivas de mesa (DOUGERAKI et al., 2013).

Em muitos dos alimentos fermentados por BAL, especialmente frutas e vegetais, a microbiota natural, quando em condições favoráveis de anaerobiose, atividade de água, concentração de sal e temperatura, promove a fermentação espontânea. Nesses casos, as leveduras podem ou não estar presentes no processo fermentativo, e em consequência das modificações do meio, as bactérias Gram-negativas são inibidas nos estágios iniciais do processo. A população microbiana de frutas e vegetais corresponde a cerca de 5,0 – 7,0 log UFC/g, de modo que as BAL correspondem a 2,0 – 4,0 log UFC/g dessa população (DI CAGNO et al., 2013).

Estudos (DI CAGNO et al., 2013; FRANCO; ILENYS; PÉREZ-DÍAZA et al., 2012; NYANGA et al., 2007; SAGDIC et al., 2014) têm demonstrado a importância das BAL no controle e na qualidade de produtos fermentados. Tanto o uso de cepas autóctones, ou seja, cepas que foram isoladas de determinado fruto e que depois foram inseridas como culturas iniciadoras em um produto de mesma natureza, como o uso de BAL comerciais têm sido utilizado para o desenvolvimento de processos fermentativos controlados. Segundo Franco; Ilenys; Pérez-Díaza, et al. (2012), em alguns produtos fermentados de frutas, o início da deterioração é marcado pela redução do número de bactérias lácticas e pelo aumento do pH.

Além do seu potencial tecnológico, estudos já têm demonstrado que diferentes espécies de BAL podem apresentar potencial probiótico e serem incorporadas em alimentos (ARGYRI et al., 2013; BAUTISTA-GALLEGO et al., 2013; NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011). Apesar de a maioria das cepas probióticas utilizadas comercialmente serem originárias do trato gastrointestinal de humanos (PERES et al., 2012), frutas apresentam-se como uma fonte alternativa para o isolamento desses microrganismos, tendo em vista que muitas das cepas comerciais utilizadas em produtos lácteos não desempenham o mesmo papel quando inseridas em matrizes vegetais (KARASU; SIMSEK; CON, 2010). Higashikawa et al. (2010) demonstraram que cepas de BAL de origem vegetal são tão ou mais resistentes ao suco gástrico e a bile artificiais que cepas de origem animal,

indicando um potencial promissor do uso de vegetais como fonte de microrganismos probióticos.

Do ponto de vista físico-químico, frutas apresentam características que mimetizam alguns aspectos do trato gastrointestinal humano. As frutas comumente apresentam elevadas quantidades de ácidos orgânicos que mantêm o pH do meio ácido, apresentam capacidade tamponante, alta concentração de fibras, açúcares livres, vitaminas e sais minerais, permitindo, assim, o crescimento de microrganismos exigentes como as BAL (PERES et al., 2012; VITALI et al., 2012).

Os microrganismos tendem a se localizar em poros ou em irregularidades naturalmente presentes sobre a superfície das frutas intactas. Esses sítios favorecem a ligação do microrganismo ao vegetal e conferem proteção (MARTINS et al., 2013). De acordo com Kourkoutas et al. (2006), frutas, como maçãs e pêras, devido ao seu conteúdo de celulose, podem exercer efeito protetor sobre os microrganismos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Como resultado, a integridade bacteriana de probióticos é mantida, permitindo que estes microrganismos atinjam o cólon. Martins et al. (2013) demonstraram que frutas, como maçã, goiaba, banana e melão, possuem potencial de atuarem como carreadores de probióticos. A partir de resultados de microscopia eletrônica de varredura, os autores verificaram aderência entre os microrganismos e os tecidos das frutas. Dessa forma, características intrínsecas da superfície de frutas, como sua microarquitetura, presença de sulcos e compostos prebióticos naturais (ex., oligossacarídeos), além da presença de outros nutrientes, podem proteger os microrganismos probióticos das condições adversas do trato gastrointestinal (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Apesar de alimentos lácteos apresentarem boas características como carreadores de microrganismos probióticos, uma parcela importante da população não pode ingeri-los em decorrência de restrições clínicas, como intolerância à lactose, alergia à proteína do leite de vaca e restrição do consumo de colesterol, ou até mesmo por questões culturais ou de predileção por dietas que restringem o uso deste grupo de alimentos (DI CAGNO et al., 2013; PAIM et al., 2016; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011). Além dessas questões, o uso de frutas como base para elaboração de alimentos probióticos, a exemplo de sucos, abrange o leque de produtos já disponíveis dessa categoria de bebidas. Os sucos são ricos em nutrientes e compostos bioativos, reconhecidos como alimentos saudáveis e consumidos regularmente, o

que são características importantes para o estabelecimento dos benefícios promovidos por cepas probióticas em decorrência do consumo regular (COSTA et al., 2013).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos com foco na avaliação do potencial probiótico de BAL isoladas de frutas quando inseridas em sucos, com análises de desempenho funcional e tecnológico das cepas incorporadas (ARGYRI et al., 2013; BAUTISTA-GALLEGO et al., 2013; DI CAGNO et al., 2011; GARCIA et al., 2016; GARCIA-RUÍZ et al., 2014; VITALI et al., 2012).

Além do uso de frutas como fonte de microrganismos probióticos, a utilização dos subprodutos industriais dessas matrizes também é uma alternativa para o isolamento e seleção destes microrganismos. O uso destes materiais torna-se interessante, visto a grande geração de subprodutos resultantes do processamento industrial, os quais, muitas vezes, são descartados de forma inadequada no ambiente ou mesmo destinados majoritariamente para a alimentação animal. No Brasil, a quantidade de subprodutos gerados a partir do processamento de frutas pode se aproximar, em peso, ou até mesmo exceder o volume de produtos industriais processados gerados (RIBEIRO DA SILVA et al., 2014). Na indústria de transformação de mamão, abacaxi e manga, entre 10 a 60% do peso do fruto transforma-se em subproduto agroindustrial que é normalmente destinado ao descarte (AYALA-ZAVALA et al., 2010).

2.4 CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E SUA INSERÇÃO EM PRODUTOS DE FRUTAS

Devido aos diversos efeitos benéficos à saúde a partir do consumo de probióticos relatados na literatura, ainda é extensiva a pesquisa de novos candidatos que possam ser veiculados não só por via medicamentosa, mas principalmente pela dieta, o que facilitaria o consumo diário prolongado. Para que cepas probióticas possam ser veiculadas em alimentos, vários aspectos tecnológicos devem ser considerados, a citar: a avaliação das características sensoriais do produto, a manutenção da viabilidade da cepa empregada até o momento do consumo e a estabilidade ao longo do período de armazenamento (SAARELA et al., 2000).

Durante as etapas de processamento, vários fatores de estresse podem comprometer a viabilidade celular do microrganismo adicionado ao produto. A exposição ao oxigênio e as variações de temperatura durante o processamento são fatores críticos na sobrevivência dessas cepas. Temperaturas ideais de multiplicação estão em torno de 37 a 43 °C, de modo que

temperaturas acima de 45 °C passam a ser prejudiciais (KORBEKANDI et al., 2011). O processo de congelamento e descongelamento também mostram-se prejudiciais as células que, apesar de sobreviverem por longos períodos sob temperaturas abaixo de – 18 °C, sofrem danos quando o processo forma grandes cristais de gelo que danificam a membrana celular e provocam vazamento do conteúdo citoplasmático (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Outro requisito fundamental para o emprego de microrganismos probióticos em alimentos é seu uso em escala industrial. Por isso, estes microrganismos são normalmente submetidos a processos de desidratação para aumentar sua viabilidade e facilitar sua inoculação nos alimentos processados. A liofilização tem sido tradicionalmente utilizada como forma de preservar essas células e permitir alta taxa de recuperação ao longo do armazenamento. Antes do processo de liofilização os microrganismos devem passar por etapas de: fermentação e concentração de massa de células; congelamento, preferencialmente em temperaturas menores que – 80 °C; e secagem sob vácuo (CHAMPAGNE et al., 2011). Apesar de ser um método que permite boa sobrevivência e integridade da morfologia celular, o emprego eficiente da liofilização necessita de otimização dos parâmetros de secagem para cada cepa selecionada (BERGENHOLTZ et al., 2012).

No estudo do potencial probiótico de novas cepas, várias características funcionais devem ser testadas inicialmente *in vitro* para avaliação da segurança e da possível eficácia do candidato a probiótico. A FAO/WHO (2002) destacam os seguintes aspectos que devem ser verificados: resistência ao pH estomacal e à bile, adesão a células epiteliais e linhagens de células epiteliais, atividade antimicrobiana contra bactérias potencialmente patogênicas, redução da capacidade de adesão de patógenos e hidrólise de sais biliares.

A resistência a passagem pelo trato gastrointestinal é uma das principais características estudadas na avaliação do potencial probiótico *in vitro* da cepa (GUO et al., 2010; JENSEN et al., 2012; MADUREIRA et al., 2011; MONTEAGUDO-MERA et al., 2012), visto que a cepa avaliada deve apresentar-se viável em determinada concentração para exercer seus efeitos benéficos. A avaliação de segurança, por meio da investigação de resistência a antibióticos de interesse clínico também é um requisito básico na seleção de novos candidatos à probióticos. A resistência a antibióticos torna-se um problema quando está associada a mecanismos de transferência horizontal. A European Food Safety Agency (EFSA), agência financiada pela União Europeia, exige a ausência de genes resistentes a antibióticos transferíveis como um pré-requisito para a aprovação de um microrganismo, EFSA (2012).

Além da avaliação das propriedades probióticas da cepa, a adaptação da cepa na matriz alimentar de destino é fundamental para que esses microrganismos possam ser carregados ainda viáveis quando consumidos. Destacam-se atualmente investigações que propõem produtos derivados de frutas que veiculam BAL, tais como o estudo de Pereira; Maciel; Rodrigues et al. (2012) que desenvolveram suco de caju e maçã fermentado com *L. casei* NRRL B-442, o qual apresentou satisfatória qualidade quanto aos parâmetros físico-químicos, além de manutenção da viabilidade da cepa probiótica adicionada após 42 dias de armazenamento refrigerado. Nualkaekul; Charalampopoulos (2011) avaliaram a inserção de *L. plantarum* NCIMB 8826 em diferentes sucos de fruta comerciais e verificaram que nos sucos de laranja, toranja, groselha, abacaxi e limão a cepa manteve-se viável por seis semanas, sendo sugerido que essa sobrevivência poderia estar associada aos níveis de ácido cítrico, fibras e proteínas presentes nos sucos.

Assim como a viabilidade da cepa e os aspectos de qualidade físico-química dos sucos, outros indicadores de qualidade precisam ser observados quanto à interação com a cepa inserida no produto. Alguns estudos avaliaram as características sensoriais de sucos (MOREIRA et al., 2017; PERRICONE et al., 2014; PIMENTEL; MADRONA; PRUDÊNCIO, 2015) e *smoothies* (DI CAGNO et al., 2011) a base de frutas quando inoculados com bactérias probióticas, sendo verificado que a inserção de BAL não teve influência negativa nos aspectos sensoriais dos produtos formulados.

Apesar de, nos estudos citados, as bactérias se manterem viáveis nos sucos de fruta avaliados, dependendo do tipo de fruta empregada ou do método de conservação ou de inoculação das bactérias, essa viabilidade pode ser aumentada ao longo da vida de prateleira. Alguns estudos destacam o emprego de diferentes tecnologias como forma de aumentar a vida de prateleira desses produtos juntamente com a manutenção da viabilidade das cepas. Alves et al. 2016 realizaram estudo com suco de laranja comercial adicionado de *Lactobacillus casei* NRRL B-442, e a partir do produto fermentado foi avaliada a influência do emprego da técnica de “spray-dry” sobre a sobrevivência da cepa e dos parâmetros físico-químicos do produto final. Já Moreira et al. (2017) utilizaram a alta pressão como método de conservação para suco de juçara e manga inoculados pós-processamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG, enquanto Costa; Fonteneles e Rodrigues (2013) utilizaram o tratamento ultrassônico em suco de abacaxi que foi, posteriormente, fermentado com *Lactobacillus casei* NRRL B-442.

Apesar de já existirem estudos, como os citados anteriormente, que desenvolveram sucos de frutas como veículos de bactérias probióticas, ainda são escassos os estudos que avaliam a inserção de cepas isoladas de matrizes de fruta e inoculadas em produtos derivados de matrizes com características semelhantes à matriz de isolamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAIS DE EXECUÇÃO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos (análises microbiológicas, análises físico-químicas e identificação dos isolados) e Laboratório de Bromatologia de Alimentos (análises de cor), vinculados ao Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba; Laboratório de Bioquímica (avaliação da viscosidade), vinculado ao Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba; Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (identificação por MALDI-TOF), vinculado ao Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro; Plataforma de Sequenciamento (análises de sequenciamento de DNA), Departamento de Genética, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco; e Laboratório de Análise de Águas e Bebida, Departamento de Tecnologia em Alimentos, Curso de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Pernambuco - Campus Petrolina (determinação de açúcares e ácidos orgânicos nos sucos).

3.2 MATERIAL

Os subprodutos de frutas foram obtidos de uma indústria de processamento de polpas de frutas, localizada na cidade de João Pessoa – PB, compreendendo um período de 60 dias para as coletas, as quais ocorreram semanalmente. Os subprodutos de fruta foram coletados, também de forma asséptica, diretamente do equipamento (despolpadeira) onde foram gerados, sendo compostos principalmente de cascas, sementes e restos de polpa. Após serem acondicionadas em sacos estéreis, as amostras foram mantidas em caixas isotérmicas com gelo para serem transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos/DN/CCS/UFPB, onde foram imediatamente direcionadas para as análises.

As amostras coletadas incluíram subprodutos de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), manga (*Mangifera indica* L.), acerola (*Malpighia glabra* L.), caju (*Anacardium occidentale*), graviola (*Annona muricata*), morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) e goiaba (*Psidium*

guajava), os quais foram selecionados com base na disponibilidade apresentada pela indústria onde as coletas foram realizadas.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Isolamento e Caracterização

As amostras provenientes das coletas foram pesadas (25 g), diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% v/v esterilizada, homogeneizadas durante três minutos a temperatura ambiente em homogeneizador de amostras (modelo A440, Marconi Equip. Lab. Ltda., Piracicaba, Brasil) e, em seguida, diluídas em série (10^{-1} a 10^{-5}) com o mesmo diluente. Alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar de Man Rogosa & Sharpe (MRS), ágar MRS suplementado com cloridrato de cisteína (0,05 g/100mL) e ágar M17, para isolamento de BAL, e incubadas (37 °C/48 – 72 h) em condições de anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK).

Após verificação de crescimento bacteriano, as placas foram avaliadas quanto a morfologias das colônias presentes e, em seguida, cinco colônias de cada morfologia observada foram coletadas e isoladas novamente no meio de cultura correspondente ao meio do plaqueamento de origem. Após isolamento, as colônias foram incubadas sob as mesmas condições já descritas e, posteriormente, submetidas aos testes iniciais de identificação.

Cada isolado foi submetido ao teste de coloração de gram e avaliação da atividade de catalase (YANG et al., 2010). Os isolados que se apresentaram como gram positivos e catalase negativos foram selecionados, inoculados em caldo MRS e incubados a 37 °C em aerobiose durante 24 - 48 horas. Após observar-se turvação do meio de cultivo, 1 mL da amostra foi coletado e inserido em criotubo contendo 20% (v/v) de solução de glicerol (80%, v/v), o qual foi armazenado em temperatura de congelamento (-20 °C).

3.3.2 Identificação dos isolados pela técnica de MALDI-TOF – “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight”

A partir dos testes prévios de identificação bacteriana, 106 isolados foram mantidos sob temperatura de congelamento (-18 °C) para futura identificação em nível de espécie.

Inicialmente, esses isolados foram submetidos à identificação por meio da técnica de MALDI-TOF como procedimento de triagem de identificação de gêneros de interesse dentre as BAL.

A partir de cada criotubo de isolado bacteriano, uma alíquota de cerca de 10 µL foi coletada e inoculada em caldo MRS, incubado a 37 °C/24 – 48 horas em aerobiose, e, posteriormente, 100 µL do caldo foi inoculado em placa contendo ágar MRS ou M17, seguindo-se por incubação a 37 °C/24 – 48 horas sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK). Com o auxílio de um “swab” de transporte para bactérias anaeróbias, as colônias foram transportadas até o Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde, posteriormente, foram novamente inoculadas em placas contendo ágar MRS ou M17 sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Dos 106 isolados, 38 não apresentaram viabilidade após o transporte e 68 foram então submetidos à identificação por meio da técnica de MALDI-TOF. Para o emprego da técnica, os 72 isolados foram submetidos a um processo de extração segundo metodologia adaptada por Freiwald e Sauer (2009). Aproximadamente, 20 colônias de cada isolado cultivado em ágar MRS ou M17 foram ressuspensas em 1,2 mL de etanol a 75% (v/v). Após centrifugação e descarte do sobrenadante, as proteínas foram extraídas com 50 µL de uma solução de acetonitrila, ácido fórmico e água. Após essa etapa, alíquotas de 1 µL do sobrenadante foram depositadas em três poços da placa para análise. Após secagem das amostras na placa, adicionou-se em cada poço 1 µL de solução de ácido alfa-ciano-4-hidroxycinâmico em mistura de acetonitrila : água : ácido trifluoroacético (TFA) (10 mg/mL; Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

A análise das amostras foi realizada em espectrômetro de massa MALDI-TOF Bruker Biotyper 3.1. O equipamento foi previamente calibrado usando padrão de *Escherichia coli* DH5. Os espectros de massa obtidos após análise foram processados usando software MALDI Biotyper™ 3.1 (Bruker Biotyper 3.1, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os resultados foram expressos pela identificação de log BioTyper (pontuações), indicando a similaridade do perfil de espectro de massa MALDI-TOF desconhecido para as entradas do banco de dados disponíveis. Na análise dos resultados, valores de Log BioTyper (score) superior a 2,3 indicavam identificação de alta probabilidade de confirmação de espécie; valores de Log BioTyper (score) entre 2,0 e 2,3 indicavam alta probabilidade de confirmação de gênero e provável espécie; e valores de Log BioTyper (score) entre 1,7 e 2,0 indicavam apenas em

provável identificação de gênero. Valores de Log BioTyper (score) abaixo de 1,7 indicavam perfil não identificado quando comparado com as entradas do banco de dados.

Os espectros de identificação gerados foram automaticamente comparados com a biblioteca de referência do software MALDI BiotyperTM 3.1 (Bruker Biotyper 3.1, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Por fim, 68 isolados analisados puderam ser identificados utilizando a técnica de MALDI-TOF.

3.3.3 Identificação molecular dos isolados

Os isolados identificados previamente utilizando a técnica de MALDI-TOF, foram também submetidos a identificação molecular por meio da detecção da sequência de genes 16S rRNA. Inicialmente, o DNA dos isolados foi extraído usando um kit comercial de extração (Promega, Wisconsin, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para a detecção da sequência de genes 16s-rRNA foram utilizados os primers 27F (50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30) e 1492R (50-GGTTACCTTGTTACGACTT-30). A PCR (“Polymerase Chain Reaction”) foi realizada em termociclador (Applied Biosystems, EUA) e as reações continham 0.5 µM de cada primer, 0,2 mM dNTP mix, 1.5 mM MgCl₂ e 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Califórnia, EUA) em um volume final de 50 µL. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; ciclos de desnaturação a 93 °C por 30 segundos; anelamento a 55 °C por 1 minuto; extensão a 72 °C por 1 minuto; e ciclo final a 72 °C por 10 minutos (GUO et al., 2010).

Os produtos da PCR foram purificados utilizando kit de purificação de DNA comercial (Invitrogen, Alemanha). O DNA purificado foi submetido ao sequenciamento utilizando os mesmos primers 27F e 1492R com kit de reação de sequenciamento do ciclo terminador (ABI PrismTM BigdyeTM, Applied Biosystems, EUA). As sequências resultantes de 1465 pb foram analisadas utilizando o pacote de ferramentas do software Pregap4 e Gap4 STADEN 1.6, e submetidas a pesquisa de similaridade no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) usando a ferramenta Blast N (Altschul et al., 1997; Guo et al., 2010) e Ribosomal Database Project (RDP). A identificação bacteriana foi confirmada quando a sequência de pesquisa mostrou similaridade > 97% para a sequência do gene 16S rRNA (GEVERS et al., 2003; GUO et al., 2010). Uma porção da sequência foi comparada com as sequências na base de dados pública GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.3.4 Avaliação do potencial probiótico

Após os testes descritos nos itens 3.3.2 e 3.3.3, foram identificados isolados pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*. Como objeto de estudo desta tese, foram selecionados 20 isolados de *Lactobacillus* spp. para serem avaliados quanto ao potencial probiótico. Destes 20 isolados estudados, foi selecionado um isolado de cada espécie identificada que apresentou os melhores resultados nos testes de avaliação do potencial probiótico para a construção dos artigos apresentados neste trabalho.

3.3.4.1 Tolerância a diferentes valores de pH

Inicialmente, as cepas de *Lactobacillus* selecionados foram inoculados em caldo MRS, seguido de incubação a 37 °C durante 48 horas sob aerobiose. Caldos com crescimento visível sofreram ajuste de inóculo para obter-se $OD_{625\text{ nm}} = 0,5$ (absorbância), correspondente a cerca de 6 – 7 log UFC/mL. Os caldos foram centrifugados por 3 minutos a 10.000 rpm/4 °C e os “pellets” foram lavados duas vezes com tampão fosfato (PBS) pH 7,2. A tolerância das cepas a diferentes valores de pH foi determinada a partir do ajuste do pH com ácido clorídrico 1M para 2; 3; 5; e 7,2 (controle), com posterior incubação a 37 °C após 1, 2 e 3 horas. A cada período de tempo, uma alíquota das soluções foi tomada, diluída (10^{-1} – 10^{-5}) em solução salina esterilizada e inoculada em placas contendo ágar MRS, seguindo-se por incubação a 37 °C/48 horas sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK), para contagem de células viáveis (REHAIEM et al., 2014; SAARELA et al., 2006). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

3.3.4.2 Tolerância a diferentes concentrações de sais de bile

Inicialmente, os isolados selecionados foram inoculados em caldo MRS, seguindo-se de incubação a 37 °C durante 48 horas sob aerobiose. Caldos com crescimento visível sofreram ajuste de inóculo para obter-se $OD_{625\text{ nm}} = 0,5$ (absorbância), correspondente a cerca de 6 – 7 log UFC/mL. Os caldos foram centrifugados por 3 minutos a 10.000 rpm (4 °C), e os “pellets” foram lavados duas vezes com tampão fosfato (pH 7,2), sendo finalmente diluídos

em soluções teste elaboradas com PBS com concentrações de 0 (controle), 1, 2 e 3% de sais biliares (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA). As soluções foram incubadas a 37 °C por 0 (logo após a inoculação no meio), 1, 2 e 3 horas. A cada período de tempo, uma alíquota das soluções foi tomada, diluída (10^{-1} – 10^{-5}) em solução salina esterilizada e inoculada em placas contendo ágar MRS, seguindo-se por incubação a 37 °C/48 horas sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK), para a contagem de células viáveis (REHALEM et al., 2014; SAARELA et al., 2006). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

3.3.4.3 Antagonismo frente a bactérias patogênicas

Na avaliação de antagonismo frente a bactérias patogênicas, os isolados de *Lactobacillus* foram testados frente cepas de *Staphylococcus aureus* (INCQS 00015, origem ATCC 25923), *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (INCQS 00150, origem ATCC 14028), *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (INCQS 00258, origem 13076), *Listeria monocytogenes* (INCQS 00266, origem ATCC 7644) e *Escherichia coli* (INCQS 00219, origem 8739), pertencentes a coleção de cepas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, utilizando-se as técnicas “ágar spot test” e difusão em poço do sobrenadante livre de células (SLC).

Para a realização dos testes, caldo MRS foi inoculado com as cepas de lactobacilos e ajustado para a OD 625nm = 0,5, correspondendo a 6 – 7 log UFC/mL. As cepas de bactérias patogênicas foram inoculadas em caldo *brain-heart-infusion* (BHI) a 37 °C durante 24 horas, com inóculo ajustado a OD 625nm = 0,1, correspondendo a, aproximadamente, 5 log UFC/mL.

- “Agar spot test”: Nesse método, a partir do caldo inoculado com o isolado de lactobacilo, uma alíquota de 10 µL foi transferida, utilizando a técnica de microgota, para placa de Petri previamente preparada contendo ágar MRS, e, em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas sob anaerobiose. Após esse período, verteu-se uma sobrecamada de 20 mL de ágar BHI semissólido contendo a espécie de bactéria patogênica indicadora a ser testada. As placas foram novamente incubadas a 37 °C durante 24 h em aerobiose. Após esse período, foi realizada a leitura do halo de inibição do crescimento utilizando-se um paquímetro (JACOBSEN et al., 1999).

- Difusão em poço: A partir do caldo MRS inoculado com o isolado de lactobacilo obteve-se o SLC (sobrenadante livre de células) por meio de centrifugação do caldo e posterior filtração em membrana (0,22µm). Previamente, foi preparada uma placa de Petri contendo ágar BHI semissólido inoculado com uma das espécies de bactérias patogênicas indicadoras testadas. Poços de 5 mm foram feitos na placa contendo o ágar BHI e 50 µL de SLC foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C/24 horas em aerobiose. Após o período de incubação, realizou-se a leitura do halo de inibição do crescimento utilizando-se um paquímetro.

Para ambos os testes, foi considerada atividade antagônica positiva quando foi verificada a formação de halos de inibição de crescimento da cepa reveladora com diâmetro igual ou superior a 1 mm. Placas contendo ágar MRS não inoculadas foram utilizadas como controle negativo (JACOBSEN et al., 1999; VITALI et al., 2012).

3.3.4.4 Resistência a antibióticos

Para os testes de resistência aos antibióticos, as cepas de lactobacilos foram inoculadas (1%, v/v) em caldo MRS suplementado com os seguintes antibióticos: cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, eritromicina, tetraciclina e estreptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) em concentrações finais de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 µg/mL; e ampicilina, clindamicina e vancomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) em concentrações finais de 0,125; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 64 µg/mL. Os testes foram realizados em triplicata utilizando-se o método de micro diluição em caldo de acordo com metodologia descrita pelo CLSI (2012) e por Argyri et al. (2013).

Em cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL de caldo MRS, 50 µL de solução de antibiótico e 50 µL da suspensão do respectivo isolado a ser testado (contagem entre 6 – 7 log UFC/mL). Também foram utilizados em cada microplaca poços apenas com caldo MRS sem adição de antibiótico (controle negativo) e poços com inóculo bacteriano sem antibiótico (controle positivo). As microplacas foram seladas, levemente agitadas para mistura das soluções e, em seguida, incubadas a 37 °C/48 horas sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK).

Após período de incubação, o crescimento bacteriano foi observado visualmente e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como sendo a menor concentração de

cada antibiótico capaz de inibir o crescimento visível do isolado testado. Com base nos valores de corte para CIM de BAL determinado pelo EFSA (2012), as cepas foram classificadas como sensíveis (quando a concentração em µg/mL encontrada no teste foi igual ou menor que o valor de corte da referência para cada droga) ou resistentes (quando a concentração em µg/mL encontrada no teste foi maior que o valor de corte de referência para cada droga).

3.3.5 Determinação da viabilidade dos isolados em Caldo General Edible Medium (GEM) e de Man, Rogosa, Sharpe (MRS)

Dos 20 isolados submetidos aos testes descritos no item 3.2.4, foram selecionados cinco isolados, sendo um de cada espécie identificada (Quadro 1) para serem submetidos ao teste de viabilidade em GEM e MRS, bem como ao processo de liofilização e, em seguida, serem inseridos em sucos de fruta para avaliação da estabilidade das matrizes inoculadas, bem como da viabilidade dos isolados nesta matriz e da sobrevivência em condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI).

Quadro 1 – Identificação dos isolados selecionados para liofilização e inserção em sucos de fruta.

Cepas	Subproduto
<i>Lactobacillus plantarum</i> 49	Acerola (<i>Malpighia glabra</i> L.)
<i>Lactobacillus brevis</i> 59	Acerola (<i>Malpighia glabra</i> L.)
<i>Lactobacillus paracasei</i> 108	Graviola (<i>Annona muricata</i> L.)
<i>Lactobacillus fermentum</i> 111	Graviola (<i>Annona muricata</i> L.)
<i>Lactobacillus pentosus</i> 129	Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)

Os ensaios foram realizados em Caldo MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) e Caldo GEM, o qual foi elaborado com: 40 g/L de glicose, 30 g/L de peptona de soja, 7 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de MgSO₄.7H₂O em tampão fosfato com pH ajustado para 6,3 (SAARELA et al., 2004). Os isolados testados foram cultivados em caldo MRS e caldo GEM (incúculo de 1% v/v, correspondendo a aproximadamente 7 log UFC/mL), com incubação sob agitação (150 rpm) a 37 °C em aerobiose durante 24 horas. Após o período de incubação, as culturas foram

inoculadas em 200 mL de caldo MRS e caldo GEM sob as mesmas condições de incubação durante 48 horas. Amostras foram coletadas em diferentes períodos de incubação, no tempo zero e após 16, 24 e 48 horas para contagem de células viáveis em placas contendo ágar MRS (PIMENTEL et al., 2012). Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

3.3.6 Liofilização e avaliação da viabilidade dos isolados durante armazenamento congelado (-18 °C)

O processo de obtenção dos isolados liofilizados foi realizado em cinco etapas subsequentes: inoculação, fermentação, concentração, congelamento e liofilização. A primeira etapa consistiu da coleta de alíquotas das culturas estoque (-18 °C) dos cinco isolados selecionados e inoculação em placas contendo ágar MRS. Após 48 h de incubação em anaerobiose a 37 °C, uma colônia de cada espécie foi inoculada em 4 mL de caldo MRS por 24h/37 °C sob anaerobiose, com subsequente transferência para 200 mL de caldo GEM (2% de inóculo, v/v) também incubado a 24h/37 °C sob anaerobiose. Em seguida, 2L de caldo GEM foi inoculado com 40 mL da cultura overnight anterior para fermentação a 37 °C sob agitação (50 rpm) em aerobiose durante 22 horas. Este tempo de incubação foi estabelecido com base nas curvas de crescimento (dados não apresentados) das espécies selecionadas, o qual coincide com a fase estacionária da curva de crescimento dos isolados. Posteriormente, deu-se início à fase de concentração de células, com centrifugação (4,000 x g, 10 min, 4 °C), ressuspensão (contagem de células viáveis de 8-9 log UFC/mL) da massa de células em tampão fosfato (pH 7,2) com 5% de sacarose, sendo finalmente submetida ao congelamento a -80 °C durante 24 horas.

As amostras congeladas foram então submetidas ao processo de liofilização em temperatura de -55 ± 2 °C, pressão a vácuo abaixo de 138 µHg e velocidade de liofilização de 1mm/h por aproximadamente 40 h utilizando liofilizador de bancada (modelo L-101, Liotop, São Carlos-SP, Brasil). Porções de 4 g dos pós secos obtidos foram embaladas em sacos BOPP metalizados, hermeticamente fechados e armazenados em condições de congelamento (-18 ± 2 °C).

Em diferentes intervalos de tempo de armazenamento (1, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias) o número de células viáveis foram enumeradas (Saarela et al., 2006a). A reidratação dos pós foi realizada em PBS (pH 7,2), à temperatura ambiente durante 10 min (Saarela et al., 2009).

Para avaliação da viabilidade das cepas liofilizadas durante o armazenamento sob congelamento (- 18 °C), as culturas liofilizadas foram ressuspensas em tampão fosfato pH 7,2, e homogeneizadas à temperatura ambiente durante 10 minutos. A concentração foi ajustada para $OD_{625nm} = 2,0$ ($8 - 9 \log$ UFC/mL), e, em seguida, as amostras foram diluídas em solução salina (10^{-1} a 10^{-5}) e inoculadas em placas de Petri contendo ágar MRS, sendo incubadas sob anaerobiose a 37 °C/48 horas (AMPATZOGLOU et al., 2010). A avaliação da viabilidade das células foi realizada após 1, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento (SAARELA et al., 2006 b) por meio da determinação do número de células viáveis em placas com ágar MRS incubadas a 37 °C/48 horas sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). Os resultados da viabilidade celular foram expressos como taxa de sobrevivência (N / N_0), onde N é a contagem viável ($\log$ UFC/mL) das células liofilizadas em cada um dos intervalos de tempo de armazenamento monitorados e N_0 é a contagem viável em suspensão celular antes do armazenamento congelado. O limite de detecção utilizado para enumerar células de *Lactobacillus* foi de 1 $\log$ UFC/mL.

3.3.7 Inserção dos isolados liofilizadas em sucos de fruta

Três diferentes sucos comerciais (suco de maçã Natural One™, suco de laranja Do Bem™ e suco de uva Quinta do Morgado™) foram adquiridos em supermercados na cidade de João Pessoa (Paraíba, Brasil), ambos contendo 100% de suco de fruta, sem polpa e aditivos ou conservantes. Aliquotas de 200 mL dos sucos foram acondicionados em frascos de vidro, esterilizados durante 15 minutos a 121 °C em autoclave e, em seguida, resfriados em banho de gelo até atingir 37 °C. Antes da inoculação, os sucos foram analisados para avaliar a ausência de bactérias ácido lácticas e microrganismos deterioradores utilizando-se a técnica de inoculação em superfície em placas contendo Ágar MRS (HiMedia, Mumbai, Índia), Plate Count Agar (HiMedia, Mumbai, Índia) e Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia, Mumbai, Índia), respectivamente (APHA, 2015). Os sucos foram inoculados (0,01 %, m/v) isoladamente com os cinco isolados de lactobacilos (Quadro1) liofilizados selecionados para estas análises. Amostras de suco de maçã, laranja e uva que não receberam adição dos isolados liofilizados foram consideradas como controle. Os sucos esterilizados foram

inoculados assepticamente com 2g das cepas selecionadas a uma concentração entre 8 - 9 log UFC/mL. Após inoculação, os sucos (inoculados e controles) foram então armazenados a $4 \pm 0,5$ °C durante 21 dias. A viabilidade dos probióticos, juntamente com as alterações nas propriedades químicas, incluindo pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais, viscosidade e cor, foram monitorados durante 21 dias de armazenamento refrigerado ($4 \pm 0,5$ °C) a cada 7 dias. A avaliação do conteúdo de açúcares e ácidos orgânicos foi realizada após 1 e 14 dias de armazenamento refrigerado. A avaliação da sobrevivência das cepas em condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI) foi realizada após um dia de armazenamento refrigerado ($4 \pm 0,5$ °C).

3.3.8 Aspectos de qualidade de sucos de fruta adicionados dos isolados liofilizados

3.3.8.1 Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada nas amostras de suco a partir de uma alíquota de 5 g, a qual adicionou-se 25 mL de água destilada e cerca de 3 gotas de fenoftaleína como indicador. A mistura foi titulada com solução de hidróxido de sódio a 0,1N e os resultados foram expressos em porcentagem de ácido málico para o suco de maçã, ácido cítrico para o suco de laranja e ácido tartárico para suco de uva (AOAC, 2016).

3.3.8.2 pH

A determinação de pH foi realizada utilizando-se potenciômetro (MODELO Q400AS, Diadema, São Paulo, Brazil) de bancada, do qual o eletrodo foi inserido diretamente em uma alíquota da amostra de suco. As medições foram realizadas a 25 ± 1 °C (AOAC, 2016).

3.3.8.3 Sólidos solúveis totais

O conteúdo de sólidos solúveis totais (°Brix) foi medido com o uso de refratômetro digital (Modelo HI 96801, Hanna Instruments, São Paulo, Brasil). As amostras de sucos foram homogeneizadas e, em seguida, uma alíquota foi transferida para o refratômetro com o auxílio de uma pipeta graduada. As medições foram realizadas a 25 ± 1 °C (AOAC, 2016).

3.3.8.4 Viscosidade

A viscosidade aparente foi medida utilizando o viscosímetro Thermo Haake (VT550, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha). As medidas experimentais foram obtidas após o estabelecimento da temperatura de equilíbrio da amostra (10 ± 1 °C) por meio do uso de banho termostático (Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha) acoplado ao equipamento. Para a determinação da viscosidade aparente, o equipamento foi operado no modo manual. As medições foram realizadas a uma taxa de deformação constante de 106 s^{-1} após estabelecimento da temperatura de equilíbrio. A viscosidade aparente foi definida como o valor de viscosidade apresentado após 30 segundos de deformação e os valores foram expressos em mPa·s (RIBEIRO, 2014).

3.3.8.5 Cor

A avaliação de cor instrumental foi realizada por meio do uso de colorímetro CR-300 (Minolta Co., Osaka, Japão). Antes da medição dos parâmetros de cor, o colorímetro foi calibrado com uma placa de cerâmica branca padrão ($L^* = 96$; $a^* = 0,14$, $b^* = 1,63$). Para a medição foi utilizado o iluminante D65 (luz do dia normal) a um ângulo de 10 °. Utilizou-se a escala de cores CIE Lab (L^* , a^* , b^*) de acordo com a “International Commission on Illumination” (CIE, 2004). Também foi determinada a diferença de cor (ΔE) com base na equação: $\Delta E = \{(\Delta L^2) + (\Delta a^2) + (\Delta b^2)\}^{1/2}$, onde ΔL é a diferença de L^* da amostra controle (tempo zero) e da amostra teste; Δa é a diferença de a^* da amostra controle (tempo zero) e da amostra teste, e Δb é a diferença de b^* da amostra controle (tempo zero) e da amostra teste (DI CAGNO et al., 2011).

3.3.8.6 Ácidos orgânicos e açúcares

Os conteúdos de açúcares e de ácidos orgânicos nas amostras de sucos de maçã, laranja e uva inoculados com as cepas *L. plantarum* 49 e *L. paracasei* 108 foram determinados no 1º e 14º dia de armazenamento refrigerado ($4 \pm 0,5$ °C). Essas cepas foram selecionadas devido sua maior razão de sobrevivência, quando inseridas nos sucos de frutas. Os extratos solúveis foram obtidos por meio da homogeneização de alíquotas de 2 mL de suco em 10 mL de água ultra-pura por 10 minutos com o auxílio de um aparelho mini-Turrax.

A mistura foi centrifugada (4000 x g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante foi recolhido e filtrado através de filtro Millex-HA com poros de 0,45 µm (Millipore Co., Bedford, MA).

A determinação foi realizada simultaneamente (açúcares e ácidos orgânicos) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo AGILENT (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipado com bomba quaternária de solventes (modelo G1311C), degaseificador, compartimento de colunas termostaticado (modelo G1316A) e amostrador automático (modelo G1329B), acoplado em Detector de Arranjos de Diodos (DAD) (modelo G1315D) e Detector de Índice de Refração (RID) (modelo G1362A). Os dados obtidos foram processados utilizando o software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies). O procedimento analítico seguiu notas de aplicação descritas em Ball, Bullock, Lloyd, & Mapp (2011). Na determinação dos ácidos tartárico, málico, láctico, cítrico, succínico e acético a detecção foi realizada no DAD em 210 nm. Para os açúcares glicose e frutose a detecção foi feita no RID. A coluna utilizada foi a Agilent Hi-Plex H (300 x 7,7 mm) com partículas internas de 8,0 µm, protegida com uma coluna de guarda PL Hi-Plex H 5x3 mm (Agilent Technologies). As temperaturas do forno de colunas e detector foram mantidas em 70°C. O volume de injeção da amostra (previamente filtrada em membrana de 0,45 µm) foi de 10 µL, com fluxo de 0,5 mL/min e tempo de corrida de 20 minutos. A fase utilizada foi H₂SO₄ 4,0 mM L⁻¹ em água ultrapura (BALL et al., 2011).

Os padrões de glicose e frutose foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), enquanto os padrões para ácido cítrico, láctico, acético, tartárico, málico e succínico foram adquiridos junto à Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil), todos com pureza > 99%. Água ultrapura utilizada nos ensaios foi obtida de um sistema MilliQ® (EMD Milipore, EUA) e o ácido sulfúrico obtido da Merk (Darmstadt, Alemanha).

3.3.9 Viabilidade dos isolados liofilizados quando inseridos em sucos de fruta

Após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado, os sucos foram homogeneizados e uma amostra de cada suco foi diluída em água peptonada estéril (0,1 g/100 mL), e, em seguida, homogeneizada e diluída em série (10⁻¹ a 10⁻⁶) com o mesmo diluente. Uma amostra de 1 mL de cada diluição foi inoculada em agar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo cisteína HCl (0,05 g / 100 mL), em triplicata, e

incubadas durante 48 horas a 37 °C sob anaerobiose (Sistema Anaeróbico Anaerogénio, Oxóide). Os resultados foram expressos como taxa de sobrevivência (N/N0), onde N é a contagem viável (log UFC/mL) em sucos de frutas contendo as células liofilizadas em cada intervalo de tempo de armazenamento monitorado e N0 é a contagem viável no mesmo suco de fruta imediatamente após a incorporação das células liofilizadas. Sucos sem adição de células de lactobacilos liofilizados foram considerados amostras controle.

3.3.10 Sobrevivência das cepas em condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI)

Amostras de sucos adicionados dos isolados de lactobacilos liofilizados e sucos controle (sem adição dos isolados) foram expostos a condições simuladas do trato gastrointestinal. Para isso, alíquotas de 25 mL de suco foram inseridas em frascos de vidro (50 mL), nos quais as etapas seguintes do teste ocorreram subsequentemente. A simulação foi realizada em estágios referentes à mastigação, esôfago-estômago, duodeno e íleo, como descritos no quadro 2. A agitação mecânica foi utilizada para simular os movimentos peristálticos e todo o teste foi realizado a temperatura de 37 °C com agitação ajustada para cada fase (Quadro 2) em estufa incubadora (TE-424, Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil).

O processo de simulação foi contínuo com o aumento gradual do volume inicial de amostra (25 mL) à medida que as soluções de cada fase da simulação foram adicionadas. A mastigação foi simulada por meio da adição de uma solução de α -amylase (100 U/ mL CaCl_2 0,1M) e pH ajustado para 6,9 com solução de 1M NaHCO_3 sob agitação de 200 rpm durante 2 minutos. A fase de simulação da passagem pelo esôfago-estômago foi realizada a partir da adição de solução de pepsina (25 mg/mL HCl 0,1 M) a uma razão de 0,05 mL/min com redução gradual do pH da mistura usando solução de HCl a 1M (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 2.0 / 20 min) e agitação durante toda a fase de 130 rpm. O duodeno foi simulado com adição de solução contendo pancreatina (2 g de pancreatina/mL NaHCO_3 0,1M) e solução de sais de bile (12 g de sais de bile bovino/mL de NaHCO_3 0.1M) com ajuste de pH para 5,0 com NaHCO_3 a 0,1M, sendo expostos durante 30 minutos a 45 rpm. Finalmente, a fase de simulação do íleo consistiu de ajuste de pH para 6,5 com solução de NaHCO_3 0,1M e tempo de exposição de 60 minutos a 45 rpm, (OLIVEIRA et al., 2014).

Todas as enzimas e os sais de bile foram adquiridos junto a Sigma Aldrich, St. Louis, USA. Ao longo de todo o teste, amostras de caldo MRS e dos sucos inoculados foram mantidos a 37 °C sem exposição às condições simuladas do TGI, sendo utilizados como controle. A cada tempo correspondente das fases do teste de simulação, uma alíquota de 100 µL da amostra exposta às condições simuladas do TGI e da amostra controle era tomada, diluída (10^{-1} - 10^{-6}) e cada diluição era inoculada em placas de petri contendo ágar MRS suplementado com HCl cisteína (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), seguido de incubação a 37 °C/48h sob anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). Os resultados foram expressos como taxa de sobrevivência (N/N0), onde N é a contagem viável (log UFC/mL) em sucos de frutas ou caldo MRS contendo as células liofilizadas em cada etapa monitorada da digestão *in vitro* e N0 é a contagem viável nos mesmos sucos de frutas ou caldo MRS imediatamente após a incorporação das células liofilizadas.

Quadro 2 – Condições simuladas do trato gastrointestinal (Adaptado de Oliveira et al., 2014)

Fase	Solução	Agitação (rpm)	pH	Tempo de exposição (min)
Boca	Saliva	200	6,9	2
Esôfago-Estômago	Pepsina	130	5,5	10
		130	4,6	10
		130	3,8	10
		130	2,8	20
		130	2,3	20
		130	2,0	20
Duodeno	Pancreatina + Sais de Bile	45	5,0	30
Íleo		45	6,5	60

3.3.11 Análises estatísticas

Os ensaios foram realizados em triplicata em dois experimentos independentes e os resultados expressos como uma média dos resultados obtidos nos ensaios. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (ANOVA seguida de teste de Tukey ou test t de Student) para determinação de diferenças significantes ($p \leq 0,05$) entre as médias dos resultados obtidos. Para o tratamento estatístico, foi utilizado o software Sigma Stat. 2.03.

REFERÊNCIAS

- AHMADOVA, A.; TODOROV, S. D.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; ZADI, T. M.; KULIYEV, A.; FRANCO, B. D. G. M.; CHOBERT, J.-M.; HAERTLÉ, T. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, Netherlands, v. 30, p. 631-641, 2013.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, United Kingdom, v.25, p. 3389–3402, 1997.
- ALVES, N. N.; MESSAOUD, G. B.; DESOBRY, S.; COSTA, J. M. C.; RODRIGUES, S. Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice Powder. *Journal of Food Engineering*, United Kingdom, v. 189, p. 45-54, 2016.
- ANGMO, K.; KUMARI, A.; SAVITRI; BHALLA, T. C. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Science and Technology*, United States, v. 66, p. 428-435, 2016.
- AMARA, A. A.; SHIBL, A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*, Netherlands v. 23, p. 107–114, 2015.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH - APHA. Compendium for the microbiological examination of foods. American Public Health, Washington D.C., 2015.
- AMPATZOGLOU, A.; SCHURR, B.; DEEPIKA, G.; BAIPONG, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Biochemical Engineering Journal*, Netherlands, v. 52, p. 65–70, 2010.
- ARGYRI, A. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K.-A. G.; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G. J. E.; PANAGOU, E. Z.; TASSOU, C. C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, United States, v. 33, p. 282-291, 2013.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, Official methods of analysis of A.O.A.C. International., United States, 20th ed., 2016.
- AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A. M.; CLERICI, M.; GIOVANNINI, M.; MORELLI, L.; POLI, A.; PREGLIASCO, F.; SALVINI, F.; ZUCCOTTI, G. V. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research*, United States, v. 63, p. 366–376, 2011.

AYALA-ZAVALA, J. F.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; VEGA-VEGA, V.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: looking for integral exploitation. *Journal of Food Science*, United States, v. 25, p. 175-181, 2010.

AZAIS-BRAESCO, V.; BRESSON, J. L.; GUARNER, F.; CORTIER, G. Not all lactic acid bacteria are probiotics, . . .but some are. *British Journal of Nutrition*, United Kingdom, v. 103, p. 1079–1081, 2010.

BALL, S.; BULLOCK, S.; LLOYD, L.; MAPP, K.; EWEN, A. Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. *In Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium*, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-8801EN%20Hi-Plex%20Compendium.pdf>, 2011. Acesso em: Dez. 2016.

BAUTISTA-GALLEGO, J.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; RANTSIOU, K.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; COCOLIN, L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*, United Kingdom, v. 50, p. 135–142, 2013.

BERGENHOLTZ, A. S.; WESSMAN, P.; WUTTKE, A.; HÅKANSSON, S. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. *Cryobiology*, United States, v. 64, p. 152–159, 2012.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Brasília: ANVISA, 2008.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Brasília: ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em: Set. 2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. Brasília: ANVISA, 2013.

BURGAIN, J.; SCHER, J.; FRANCIUS, G.; BORGES, F.; CORGNEAUA, M.; REVOL-JUNELLES, A.M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; GAIANI, C. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, Netherlands, v. 213, p. 21–35, 2014.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, United Kingdom, v. 28, p. 281–370, 2002.

CHAMPAGNE, C. P.; ROSS, R. P.; SAARELA, M.; HANSEN, K. F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, Netherlands, v. 149, p. 185–193, 2011.

COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ÉCLAIRAGE – CIE. Colourimetry. 3rd ed. Vienna: CIE, 2004.

COSTA, M. G. M.; FONTELES, T. V.; JESUS, A. L. T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. Food Chemistry, United Kingdom, v. 139, p. 261–266, 2013.

CLSI. Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-22. Wayne, United States. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CROWLEY, S.; MAHONYA, J.; SINDEREN, D. V. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends in Food Science & Technology, United Kingdom, v. 33, p. 93-109, 2013.

CUELLO-GARCIA, C. A.; BROZEK, J. L.; FIOCCHI, A.; PAWANKAR, R.; YEPES-NUNEZ, J. J.; TERRACCIANO, L.; GANDHI, S.; AGARWAL, A.; ZHANG, Y.; SCHUNEMANN, H. J. Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of Allergy and Clinical Immunology, United States, v. 136, p. 952 – 961, 2015.

DI CAGNO, R.; CODA, R.; ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. Food Microbiology, United States, v. 33, p. 1-10, 2013.

DI CAGNO, R.; CARDINALI, G.; MINERVINI, G.; ANTONIELLI, L.; RIZZELLO, C.G.; RICCIUTI, P.; GOBBETTI, M. 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, United States, v. 27, p. 381-389, 2010.

DI CAGNO, R.; SURICO, R.F.; PARADISO, A.; DE ANGELIS, M.; SALMON, J.C.; BUCHIN, S.; DE GARA, L.; GOBBETTI, M. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. International Journal of Food Microbiology, Netherlands, v.128, p.473-483, 2009.

DI CAGNO, R.; SURICO, R.F.; SIRAGUSA, S.; DE ANGELIS, M.; PARADISO, A.; MINERVINI, F.; DE GARA, L.; GOBBETTI, M. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. International Journal of Food Microbiology, Netherlands, v.127, p.220-228, 2008.

DI CAGNO, R.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C. G.; ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. Food Microbiology, United States, v. 28, p. 1062-1071, 2011.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria

in orange and apple juices. *International Food Research Journal*, Malaysia, v. 15, p. 219–232, 2008.

DOULGERAKI, A.; PRAMATEFTAKI, P.; ARGYRI, A.; NYCHAS, G. J. E.; TASSOU, C. C.; PANAGOU, E. Z. Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *LWT-Food Science and Technology*, United States, v. 50, p. 353-356, 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA. Scientific Opinion. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* v.10, p. 2740, 2012.

EWASCHUK, J. B.; DIELEMAN, L. A. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, China, v. 7, p. 5941-5950, 2006.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 2002.

FDA. 2010 Generally Recognized as Safe (GRAS) Notifications. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/AnimalFoodFeeds/GenerallyRecognizedasSafeGRASNotifications/default.htm>. Acesso em: Jul. 2016.

FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND. Probiotic Health Claims. Food Safety Authority of Ireland. 2013. Disponível em: http://www.fsai.ie/faqs/probiotic_health_claims.html. Acesso em: Jul. 2016.

FRANCO, W.; PÉREZ-DÍAZA, I. M. Role of selected oxidative yeasts and bacteria in cucumber secondary fermentation associated with spoilage of the fermented fruit. *Food Microbiology*, United States, v. 32, p. 338–344, 2012.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols*, United Kingdom, v. 4, p. 732–742, 2009.

GANZLE, M. G.; LOPONEN, J.; GOBBETTI, M. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology*, United Kingdom, v. 19, p. 513-521, 2008.

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.; SOUZA, E. L. Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. *Frontiers in Microbiology*, Switzerland, v. 7, p. 1 – 11, 2016.

GARCÍA-RUIZ, A.; LLANO, D. G.; ESTEBAN-FERNÁNDEZ, A.; REQUENA, T.; BARTOLOMÉ, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, United States, v. 44, p. 220-225, 2014.

GEVERS, D.; DANIELSEN, M.; HUYS, G.; SWINGS, J. Molecular characterization of tet (M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, United States, v. 69, p. 1270-1275, 2003.

GREGORET, V.; PEREZLINDO, M. J.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; BINETTI, A. A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. *Food Microbiology*, United States, v. 34, p. 19-28, 2013.

GUO, X. H.; KIM, J. M.; NAM, H. M.; PARK, S. Y.; KIM, J. M. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, United States, v. 16, p. 321-326, 2010.

HARB, H.; VAN TOL, E. A.; HEINE, H.; BRAAKSMA, M.; GROSS, G.; OVERKAMP, K. Neonatal supplementation of processed supernatant from *Lactobacillus rhamnosus* GG improves allergic airway inflammation in mice later in life. *Clinical & Experimental Allergy*, United Kingdom, v. 43, p. 353-64, 2013.

HEALTH CANADA. Accepted Claims about the Nature of Probiotic Microorganisms in Food. Health Canada. 2009. Disponível em: [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/labelle/claims-reclam/probiotics_claims-allegations_probiotiques-eng.php%20\(2009\)](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/labelle/claims-reclam/probiotics_claims-allegations_probiotiques-eng.php%20(2009)). Acesso em: Jul. 2016.

HIGASHIKAWA, F.; NODA, M.; AWAYA, T.; NOMURA, K.; OKU, H.; SUGIYAMA, M. Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: a double-blind, randomized trial. *Nutrition*, United States, v. 26, p. 367-374, 2010.

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

HLADÍKOVÁ, Z.; SMETANKOVÁ, J.; GREIF, G.; GREIFOVÁ, M. Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. *Acta Chimica Slovaca*, Slovakia, v. 5, p. 80-85, 2012.

HOOPER, L. V.; GORDON, J. I. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science*, United States, v. 292, p. 1115-1118, 2001.

JACOBSEN, C. N.; ROSENFELDT NIELSEN, V.; HAYFORD, A. E.; MØLLER, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PÆRREGAARD, A.; SANDSTRO, B.; TVEDE, M. M.; JAKOBSEN, M. Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, United States, v. 11, p. 4949–4956, 1999.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Netherlands, v. 153, p. 216–222, 2012.

JONES, B. V.; MARCHESI, J. R. Accessing the mobile metagenome of the human gut microbiota. *Molecular BioSystems*, United Kingdom, v. 3, p. 749–758, 2007.

KARASU, N.; SIMSEK, O.; CON, A. H. Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Annals of Microbiology*, United Kingdom, v. 60, p. 227–234, 2010.

KLAENHAMMER, T.; ALTERMANN, E.; ARIGONI, F.; BOLOTIN, A.; BREIDT, F.; BROADBENT, J. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Netherlands, v. 82, p. 29–58, 2002.

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

KOURKOUTAS, Y.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. *LWT- Food Science and Technology*, United Kingdom, v. 39, p. 980–986, 2006.

LEE, S. J.; BOSE, S.; SEO, J. G.; CHUNG, W. S.; LIM, C. Y.; KIM, H. The effects of co-administration of probiotics with herbal medicine on obesity, metabolic endotoxemia and dysbiosis: a randomized double-blind controlled clinical trial. *Clin Nutr.*, United States, v. 33, p. 973 – 981, 2014.

LI, C.; NIE, S. P.; DING, Q.; ZHU, K. X.; WANG, Z. J.; XIONG, T.; XIE, M. Y. Cholesterol-lowering effect of *Lactobacillus plantarum* NCU116 in a hyperlipidaemic rat model. *Journal of Functional Foods*, United Kingdom, v. 8, p. 340–347, 2014.

LOUSADA JÚNIOR, J. E.; COSTA, J. M. C.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. *Revista Ciência Agronômica*, Brasil, v. 37, p. 70-76, 2006.

MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; ALAZZEH, A. Y.; BAAH, J.; TEATHER, R. M.; STANFORD, K. Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v. 91, p. 193-211, 2011.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, United Kingdom, v. 44, p. 465-470, 2011.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; VANZELA, E. S. L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, C. L. O.; MARTINS, J. M. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, United Kingdom, v. 51, p. 764–770. 2013.

MONTEAGUDO-MERA, A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA, J.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARMESTO, M. R.; FERRERO, M. A. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, United Kingdom, v. 4, p. 531–541, 2012.

MOREIRA, R. M.; MARTINS, M. L.; LEITE JÚNIOR, B. R. C.; MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; CRISTIANINI, M.; CAMPOS, A. N. R.; STRINGHETA, P. C.; SILVA, V. R. O.; CANUTO, J. W.; OLIVEIRA, D. C.; PEREIRA, D. C. S. Development of a juçara and Ubá mango juice mixture with added *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. *LWT - Food Science and Technology*, United States, v. 77, p. 259-268, 2017.

NYANGA, L. K.; NOUT, M. J. R.; GADAGA, T. H.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; ZWIETERING, M. H. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, Netherlands, v. 120, p. 159–166, 2007.

NIETO-LOZANO, J. C.; REGUERA-USEROS, J. I.; PELÁEZ-MARTÍNEZ, M. C.; SACRISTÁN-PÉREZ-MINAYO, G.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A. J.; HARDISSON DE LA TORRE, A. The effect of the pediocin Pa-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*, Netherlands, v. 21, p. 679-685, 2010.

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

OLIVEIRA, M. E. G.; GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, C. E. V.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; MADUREIRA, A. R. M. F.; CONCEIÇÃO, M. L.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. 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*, United Kingdom, v.64, p. 241–247, 2014.

OLIVEIRA, G.; GONZÁLEZ-MOLERO, I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinología y Nutrición*, Spain, v. 824, p. 1-13, 2016.

PAIM, D. R. S. F.; COSTA, S. D. O.; WALTER, E. H. M.; TONON, R. V. Microencapsulation of probiotic jussara (*Euterpe edulis* M.) juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, United States, v.74, p. 21-25, 2016.

PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, United Kingdom, v. 44, p. 1276–1283, 2011.

PERES, C. M.; PERES, C.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, F. X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria e with an emphasis on table olives. Trends in Food Science & Technology, United Kingdom, v. 26, p. 31-42, 2012.

PERRICONE, M.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.; SPERANZA, B.; BEVILACQUA, A. Viability of *Lactobacillus reuteri* in fruit juices. Journal of Functional Foods, United Kingdom, v. 10, p. 421–426, 2014.

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

PIMENTEL, L. L.; MÄTTÖ, J.; MALCATA, F. X.; PINTADO, M. E.; SAARELA, M. Survival of potentially probiotic enterococci in dairy matrices and in the human gastrointestinal tract. International Dairy Journal, Netherlands, v. 27, p. 53-57, 2012.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: Sensory profile and acceptability. LWT - Food Science and Technology, United States, v. 62, p. 838-846, 2015.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. Food Research International, United Kingdom, v. 43, p. 1–7, 2010.

REQUE, P. M.; STEFENS, R. S.; DA SILVA, A. M.; JABLONSKI, A.; FLORES, S. H.; RIOS, A. O.; JONG, E.V. Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium* spp.) and 3 derived products. Food Science and Technology, United States, v. 34, p. 773-779, 2014.

REHAIEM, A.; BELGACEM, Z. B.; EDALATIAN, M. R.; MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A.; MANIA, M.; GUERRA, N. P. Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. Food Control, Netherlands, v. 37, p. 343-350, 2014.

REID, G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, United Kingdom, v.30, p. 17-25, 2016.

RIBEIRO DA SILVA, L. M.; FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. Food Chemistry, United Kingdom, v. 143, p. 398–404, 2014.

RIBEIRO, J. E. S. Elaboração de bebida fermentada funcional tipo iogurte utilizando leite de cabra e extrato hidrossolúvel de soja. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

RIJKERS, G. T.; VOS, W. M.; BRUMMER, R.-J.; MORELLI, L.; CORTHER, G.; MARTEAU, P. Health benefits and health claims of probiotics: bridging science

and marketing. *British Journal of Nutrition*, United Kingdom, v. 106, p. 1291–1296, 2011.

ROUXINOL-DIAS, A. L.; PINTO, A. R.; JANEIRO, C.; RODRIGUES, D.; MOREIRA, M.; DIAS, J.; PEREIRA, P. Probiotics for the control of obesity – Its effect on weight change. *Porto Biomedical Journal*, Portugal v. 2016, p.12-24, 2016.

RUAS-MADIEDO, P.; SANCHEZ, B.; HIDALGO-CANTABRANA, C.; MARGOLLES, A.; LAWS, A. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria and bifidobacteria. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of animal-based fermented food and beverage technology* (2nd ed.). Taylor & Francis Group, LLC, 2012.

SAARELA, M.; ALAKOMI, H.L.; PUHAKKA, A.; MÄTTÖ, J. Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. *Journal of Applied Microbiology*, United Kingdom, 106, 1204-1212, 2009.

SAARELA, M.; RANTALA, M.; HALLAMAA, K.; NOHYNEK, L.; VIRKAJÄRVI, I.; MÄTTÖ, J. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, United Kingdom, v. 96, p. 1205–1214, 2004.

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

SAARELA, M.; VIRKAJARI, I.; ALAKOMI, H. L.; SIGVARD-MATTILA, P.; MATTO, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, Netherlands, v. 16, p. 1477-1482, 2006 a.

SAARELA, M.; VIRKAJÄRVI, I.; NOHYNEK, L.; VAARI, A.; MÄTTÖ, J. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*, Netherlands, v. 112, p. 171–178, 2006 b.

SADRZADEH-YEGANEH, H.; ELMADFA, I.; DJAZAYERI, A.; JALALI, M.; HESHMAT, R.; CHAMARY, M. The effects of probiotic and conventional yoghurt on lipid profile in women. *British Journal of Nutrition*, United Kingdom, v. 103, p. 1778–1783, 2010.

SAGDIC, O.; OZTURK, O.; YAPAR, N.; YETIM, H. Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. *Food Research International*, United Kingdom, v. 64, p. 537–545, 2014.

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

SANDERS, M. E. Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, United States, v. 46, p. 58–61, 2008.

SGORLON, J. G.; RIZK, M. C.; BERGAMASCO, R.; TAVARES, C. R. G. Avaliação da DQO e da relação C/N obtidas no tratamento anaeróbio de resíduos fruti-hortícolas. *Acta Scientiarum Technology*, Brasil, v. 33, p. 421-424, 2011.

SIDIRA, M.; GALANIS, A.; NIKOLAOU, A.; KANELLAKE, M.; KOURKOUTAS, Y. Evaluation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 protective effect against spoilage of probiotic dry-fermented sausages. *Food Control*, Netherlands, v. 42, p. 315–320, 2014.

SIDIRA, M.; KANDYLIS, P.; KANELLAKE, M.; KOURKOUTAS, Y. Effect of curing salts and probiotic cultures on the evolution of flavor compounds in dry-fermented sausages during ripening. *Food Chemistry*, United Kingdom, v. 201, p. 334-338, 2016.

SONGISEPP, E.; HÜTT, P.; RÄTSEP, M.; SHKUT, E.; KÕLJALG, S.; TRUUSALU, K.; STSEPETOVA, J.; SMIDT, I.; KOLK, H.; ZAGURA, M.; MIKELSAAR, M. Safety of a probiotic cheese containing *Lactobacillus plantarum* Tensia according to a variety of health indices in different age groups. *Journal Dairy Science*, United States, v. 95, p. 5495–5509, 2011.

SUAU, A.; BONNET, R.; SUTREN, M.; GODON, J. J.; GIBSON, G. R.; COLLINS, M. D.; DORE, J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, United States, v. 65, p. 4799–4807, 1999.

TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, United Kingdom, v. 9, p. 225–241, 2014.

URSELL, L. K.; METCALF, J. L.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. Defining the Human Microbiome. *Nutrition Reviews*, United States, v. 70, p. 38–44, 2012.

VITALI, B.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C. G.; SPISNI, E.; MACCAFERRI, S.; BRIGIDI, P.; GOBBETTI, M.; CAGNO, R. D. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiology*, Netherlands, v. 31, p. 116-125, 2012.

VODNAR, D. C.; PAUCEAN, A.; DULF, F. V.; SOCACIU, C. HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, Romania, v. 38, p. 109-113, 2010.

ZHANG, X. L.; WU, Y. F.; WANG, Y. S.; WANG, X. Z.; PIAO, C. H.; LIU, J. M.; LIU, Y. L.; WANG, Y. H. The protective effects of probiotic-fermented soymilk on high-fat diet-induced hyperlipidemia and liver injury. *Journal of Functional Foods*, United Kingdom, v. 30, p. 220–227, 2017.

WHORWELL, P. J.; ALTRINGER, L.; MOREL, J. Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. The American Journal of Gastroenterology – Nature, United Kingdom, v. 90, p. 101-158, 2006.

YANG, J.; CAO, Y.; CAI, Y.; TERADA, F. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetables residues and silage fermentation. Journal of Dairy Science, United States, v. 93, p. 3136-3145, 2010.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1

IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FRUIT PULP PROCESSING
BYPRODUCTS AND POTENTIAL PROBIOTIC PROPERTIES OF SELECTED
LACTOBACILLUS STRAINS

Publicado na Frontiers in Microbiology: doi: 10.3389/fmicb.2016.01371

Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains

Running title: Potentially probiotic lactobacilli in fruit byproducts

Abstract

This study aimed to identify lactic acid bacteria (LAB) in byproducts of fruit (*Malpighia glabra* L., *Mangifera indica* L., *Annona muricata* L. and *Fragaria vesca* L.) pulp processing. Fifty strains of LAB were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and 16S rRNA gene sequence (16S rRNA) analysis. Species belonging to *Lactobacillus* genus were the predominant LAB in all fruit pulp processing byproducts. The average congruency between the MALDI-TOF MS and 16S rRNA in LAB species identification reached 86%. Isolates of *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. lactis* and *L. mesenteroides* were identified with 100% congruency. MALDI-TOF MS and 16S rRNA analysis presented 86% and 100% efficiency of LAB species identification, respectively. Further, five selected *Lactobacillus* strains (*L. brevis* 59, *L. pentosus* 129, *L. paracasei* 108, *L. plantarum* 49 and *L. fermentum* 111) were evaluated for desirable probiotic-related properties and growth behavior on two different cultivation media. The exposure to pH 2.0 sharply decreased the counts of the different *Lactobacillus* strains after a 1 or 2 h incubation, while varied decreases were noted after 3 h of exposure to pH 3.0. Overall, the exposure to pH 5.0 and to bile salts (0.15, 0.30 and 1.00%) did not decrease the counts of the *Lactobacillus* strains. All tested *Lactobacillus* strains presented inhibitory activity against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis,

Listeria monocytogenes and *Escherichia coli*, and presented variable susceptibility to different antibiotics. The selected *Lactobacillus* strains presented satisfactory and reproducible growth behavior. In conclusion, MALDI-TOF MS and 16S rRNA analysis revealed high efficiency and congruency for LAB species identification, and the selected *Lactobacillus* strains may be candidates for further investigation of novel probiotic strains.

Key words: fruit, 16S rRNA gene sequencing, MALDI-TOF profiling, *Lactobacillus*, probiotic.

INTRODUCTION

Consumption of fruit and fruit products (mostly low-processed juices and frozen pulps) has been increasing due to growing recognition of their nutritional value associated with their high content of minerals, vitamins and secondary phytochemical compounds (Rufino et al., 2010; Silva et al., 2014). The processing of fruit generates a great amount of industrial byproducts, representing 10 – 60% of the total fruit weight (Ayala-Zavala et al., 2010). These byproducts comprise peels, rinds, seeds and unused flesh, which are usually inappropriately discarded in the environment, leading to waste accumulation and negative environmental impacts (Ajila et al., 2007; Araújo et al., 2014).

The economics of processing tropical fruit could be improved by developing higher value use for their byproducts (Silva et al., 2014). In addition to the known potential use of tropical fruit pulps and their byproducts for the isolation of phytochemicals for application in nutraceutical supplements (Ayala-Zavala et al., 2011), these byproducts also exhibit a wide variety of microorganisms of interest to the food industry (Yang et al., 2010), especially lactic acid bacteria (LAB). Each particular type of fruit provides a unique environment in terms of chemical composition, buffering capacity, competitive

microbiota and natural antagonist compounds (Naeem et al., 2012). The microbial populations of raw fruit commonly vary between 5 and 7 log CFU/g, where LAB constitute a small part (2 - 4 log CFU/g) of the autochthonous microbiota (Di Cagno et al., 2010; Di Cagno et al., 2011).

Most probiotic bacteria are LAB, and among them, *Lactobacillus* is the most common genera (Argyri et al., 2013). According to FAO/WHO (2006), probiotics are non-pathogenic microorganisms, which exert a positive health benefit on the host when ingested in an adequate amount. The majority of the commercialized and most studied probiotics have been isolated from dairy products and human gastrointestinal tract (García-Ruiz et al., 2014). Although dairy foods are recognized to be the best vehicle for the delivery of viable probiotics to the human gut, the increasing number of individuals with lactose intolerance, dyslipidemia and vegetarianism reinforces the importance of the development of non-dairy probiotic products (Peres et al., 2012; Ranadheera et al., 2010), such as fruit juices. In fruit juices, the low pH (approx. 3.7) compared to the fairly neutral pH of milk (approx. 6.7) is possibly the chief determinant for the poor viability of probiotics in these matrices (Saarela et al., 2006). Raw fruit and their byproducts possess intrinsic physicochemical parameters that resemble those of the human gastrointestinal tract for some traits, such as the acidic environment and presence of anti-nutritional factors (tannins and phenols) (Vitali et al., 2012). The natural adaptation to the intrinsic characteristics of fruit may help fruit-originating bacteria to survive during the processing and storage of fruit-based probiotic formulations as well as in the human stomach.

Various LAB have been isolated from fruit as follows: *Lactobacillus rossiae* from pineapple (Di Cagno et al., 2010a,b); *L. plantarum* from tomato, pineapple, plum, kiwi, papaya, grape, strawberry and cherries (Di Cagno et al., 2008a, 2008b, 2010a, 2011a,

2011b; Naeem et al., 2012); *L. fermentum* from melon pod (Offonry and Achi, 1998); *L. brevis* from tomato (Di Cagno et al., 2008b); and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and *Pediococcus pentosaceus* from cherries (Di Cagno et al., 2011b). The identification of LAB species in fruit is typically performed using molecular tools, particularly polymerase chain reaction (PCR)-based methods and 16S rRNA gene sequencing (Dukosvá et al., 2015). Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been recently introduced with marked success into routine clinical microbiological diagnosis of human pathogens (Nomura, 2015; Welker, 2011; Bizzini et al., 2011). However, studies reporting the application of MALDI-TOF MS for bacterial identification in food microbiology are still uncommon. The capability of this technique to identify bacteria isolated from food matrices not only at the genus and species level but also at the subspecies level reveals that MALDI-TOF MS could become a key tool in food microbiology and safety (Duscová et al., 2012; Angelakis et al., 2011).

This study aimed (i) to isolate and then identify LAB in fruit pulp processing byproducts using MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequence analysis, as well as to verify the identification congruency between the two techniques; (ii) to assess the probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains *in vitro*, including acid tolerance, bile tolerance and capability to inhibit pathogenic food-related bacteria; and (iii) to verify the antibiotic resistance and growth behavior of the selected *Lactobacillus* strains in different cultivation media.

MATERIAL AND METHODS

Isolation of LAB

Samples (250 g) of fruit pulp processing byproducts of *Malpighia glabra* L. (barbados cherry), *Mangifera indica* L. (mango), *Annona muricata* L. (soursop) and *Fragaria vesca* L. (strawberry) were obtained from a company producing frozen fruit pulps located at the city of João Pessoa (Paraíba, Brazil). These byproducts were composed mostly of mashed peels and seeds as well as small amounts of mashed flesh. Initially, 25 g of each sample was suspended in 225 mL of sterile peptone water (0.1 g/100 mL) and homogenized using a stomacher (Model A440, Marconi Equip. Lab. Ltda., Piracicaba, Brazil) for 3 min at room temperature. Subsequently, serial dilutions (10^{-2} – 10^{-5}) were performed using the same diluent, and 100 μ L aliquots from each dilution were spread plated onto de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (HiMedia, Mumbai, India) containing cysteine HCl (0.05 g/100 mL) and incubated anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK) at 37 °C for 48 - 72 h. At least five colonies presenting different morphologies were randomly isolated from MRS agar plates spread with the two highest serial dilutions of each type of fruit pulp byproduct. These isolates were maintained on MRS agar slants under refrigeration and further submitted to analysis of Gram staining, morphology, catalase production and motility using standard procedures previously described (APHA, 2015). All of these analyses comprised a presumptive LAB identification step. All isolates presumptively identified as LAB (non-motile, catalase negative, Gram-positive cocci or rods) were stored at - 20 °C in MRS broth (HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol (15 mL/100 mL) for further studies.

Identification of LAB isolates

Identification using 16S rRNA gene sequence analysis

The bacterial genomic DNA was extracted using a Genomic DNA extraction kit (Promega Cooperation, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's instructions.

For the detection of 16S rRNA gene sequences, the following primers were used: 27F, 50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30, and 1492R, 50-GGTTACCTTGTTACGACTT-30. PCR was performed using a DNA thermocycler (Applied Biosystems, USA), and the reactions contained 0.5 μ M of each primer, 0.2 mM dNTP mix, 1.5 mM MgCl₂ and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Germany) in a 50 μ L final volume. The PCR was run under the following conditions: initial activation at 94 °C for 2 min; denaturation step cycles at 94 °C for 30 s; annealing step at 55 °C for 1 min; extension step at 72 °C for 1 min; and final cycle at 72 °C for 10 min (Guo et al., 2010). The PCR products were purified using a DNA purification kit (Invitrogen, Germany) and sequenced using the 27F and 1492R primers in a sequencing reaction using the ABI Prism™ BigDye™ terminator cycle sequencing reaction kit (Applied Biosystems, USA).

The resulting 1465 bp sequences were analyzed using the Pregap4 and Gap4 tools in the STADEN 1.6 software package and submitted to a search for similarity in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the blastn (nucleotide database) tool (Altschul et al., 1997; Guo et al., 2010) and Ribosomal Database Project (RDP). Bacterial identification was assumed when the query sequence showed similarity > 97% for the 16S rRNA gene sequence (Gevers et al., 2005; Guo et al., 2010). Partial 16S rRNA sequence was compared to known sequences in the NCBI Genbank database using the Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm (Altschul et al., 1990).

Identification using MALDI-TOF MS analysis

Initially, a standard protein extraction protocol adapted from Freiwald and Sauer (2009) was followed. Approximately 20 colonies of each LAB isolate culture were resuspended in 1.2 mL of 75% EtOH. After centrifugation (14000 x g, 2 min, 4 °C) and removal of the

supernatant, proteins were extracted with 50 μ L of an acetonitrile/formic acid/water mixture by vortexing for 1 min. The supernatant was then deposited in three wells of the sample plate at a volume of 1 μ L and dried at room temperature, and the samples were then overlaid with 1 μ L of a saturated alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid solution in acetonitrile:water:TFA (10 mg/mL; Bruker Daltonics, Germany).

The MALDI-TOF mass spectra measurements of samples were performed using a Bruker Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Germany). External calibration of mass spectra was performed using *Escherichia coli* DH5 alpha standard peaks. Mass spectra were processed using MALDI Biotyper™ 3.1 software (Bruker Biotyper 3.1, Bruker Daltonics, Germany). The identification results were expressed by BioTyper log (scores) indicating the similarity of the unknown MALDI-TOF MS profile to available database entries. BioTyper logs (score) ≥ 2.3 and ≤ 3.0 indicate a highly probable identification at the species level; logs (score) ≥ 2.0 and ≤ 2.3 indicate secure genus identification, and probable species identification; logs (score) ≥ 1.7 and ≤ 2.0 imply probable genus identification; and logs (score) < 1.7 imply no significant similarity between the unknown profile and any of the database entries. MALDI-TOF MS profile spectra for bacterial identification were automatically compared to the BioTyper reference library of MALDI-TOF mass spectra by MALDI Biotyper™ 3.1 software (Bruker Daltonics, Germany).

After the identification of LAB isolates, five different isolates with congruency of identification by the MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing techniques that belonged to different species from the *Lactobacillus* genus, namely, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. paracasei*, *L. plantarum* and *L. fermentum*, and that are commonly studied for probiotic properties, were selected for use in further assays of potential probiotic properties and growth behavior.

Inoculum of lactobacilli and pathogenic bacteria

Initially, each *Lactobacillus* strain was grown anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) in MRS broth at 37 °C for 20 – 24 h (stationary growth phase), harvested through centrifugation (4500 *g*, 15 min, and 4 °C), washed twice in sterile saline solution (0.85 g/100 mL) and resuspended in sterile saline solution to obtain cell suspensions with an OD reading at 660 nm (OD₆₆₀) of 0.5. This suspension provided viable counts of approximately 8 log CFU/mL for each strain when pour plated in MRS agar.

The strains of the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* (INCQS 00015, originally ATCC 25923), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (INCQS 00150, originally ATCC 14028), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (INCQS 00258, originally 13076), *Listeria monocytogenes* (INCQS 00266, originally ATCC 7644) and *Escherichia coli* (INCQS 00219, originally ATCC 8739) were obtained from the National Institute for Quality Control in Health (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil). The stock cultures were maintained in Brain Heart Infusion (BHI) broth (HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol (15 g/100 mL) at - 20 °C. Prior to use in antagonistic assays, each strain was aerobically grown in BHI broth at 37 °C for 20 – 24 h, harvested through centrifugation (4500 *g*, 15 min, and 4 °C), washed twice in sterile saline solution and resuspended in sterile saline solution to obtain cell suspensions with an OD₆₂₅ of 0.1. This suspension provided viable cell counts of approximately 8 log CFU/mL for each strain when pour plated in BHI agar (HiMedia, Mumbai, India).

Acid and bile salt tolerance assays

The tolerance to different pH values and bile salt concentrations was assessed by inoculating 1 mL aliquots of each tested *Lactobacillus* strain suspension in 10 mL of PBS (final viable cell counts of approximately 7 log CFU/mL) with pH adjusted to 2.0, 3.0 or 5.0 (using 1 M HCl) or supplemented with bile salts (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) at 1.0, 2.0 or 3.0% (w/v). The cells were incubated aerobically at 37 °C under stirring (150 rpm). At different incubation periods (1, 2 and 3 h), 1 mL aliquots were removed from each system, serially diluted in sterile peptone water (10^{-1} – 10^{-5}) and spread plated onto MRS agar for enumeration of viable cells. After an incubation period of 48 h at 37 °C under anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid), the viable cells were counted, and the results were expressed as the log of the colony forming units per mL (log CFU/mL). For controls, *Lactobacillus* strains were cultivated in PBS at pH 7.2 (adjusted using 1 M HCl) and in MRS without bile salts (Jacobsen et al., 1999; Monteagudo-Mera et al., 2012).

Antagonistic activity against pathogens

The antagonistic activity of the *Lactobacillus* strains against the indicator foodborne pathogenic bacteria was evaluated using the spot agar and well diffusion methods. For the spot agar test, a 2 µL-aliquot from each *Lactobacillus* strain suspension (approximately 7 log CFU/mL) cultivated overnight in MRS broth under anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) was spotted on the surface of MRS agar containing 0.2% (w/v) glucose and 1.2% (w/v) agar and incubated anaerobically for 24 h at 37 °C. A 1 mL-aliquot of each indicator bacterium suspension was then mixed with 18 mL of soft BHI agar (0.7% agar) (final viable count of approx. 5 log CFU/mL) 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). Uninoculated MRS agar was used as a negative control.

For the well diffusion method, *Lactobacillus* strains were first cultivated for 18 h in MRS broth under anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid), and the supernatants of these cultures were collected by centrifugation (15000 g, 15 min, and 4 °C). A 1 mL aliquot of each indicator bacterium suspension was then incorporated into 20 mL BHI soft agar plates (final viable counts of approx. 5 log CFU/mL), and 50 µL aliquots of lactobacilli supernatants were dispensed into wells (5 mm diameter and 5 mm depth; drilled using sterile glass cannulas) in BHI agar. The plates were aerobically incubated at 37 °C for 48 h. After the incubation period, the antagonistic activity was recorded as the diameter (mm) of growth inhibition zones around each well. In this assay, MRS broth was used as the negative control (Vitali et al., 2012).

In both, the spot agar and well diffusion assays, a free growth inhibition zone with a diameter greater than 1 mm (around the spot or well) was considered as positive inhibitory activity (Jacobsen et al., 1999). All the five tested lactobacilli isolates were tested for the capability to inhibit each other.

Antibiotic susceptibility testing

The minimum inhibitory concentrations of ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin and tetracycline (EFSA, 2012) against the selected lactobacilli strains were determined using a broth microdilution test previously described (CLSI, 2012) with a minor modification related to the growth media and incubation atmosphere. Approximately 50 µL of each antibiotic solution was

dispensed into each well of a 96-well microplate containing 100 μ L of MRS broth. Subsequently, a 50 μ L-culture aliquot of each test lactobacilli isolate was added to each well (final viable cell count of approximately 7 log CFU/mL). The microplate was loosely wrapped with cling wrap to prevent bacterial dehydration. Each plate included a control (without antibiotic), an inoculated sample (positive control) or an uninoculated sample (negative control). The system was anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) and statically incubated at 37 °C for 48 h. Subsequently, the bacterial growth was visually observed, and the MIC of each antibiotic was confirmed as its lowest concentration capable of inhibiting visible bacterial growth. The MIC cut-off values of EFSA (2012) were considered to categorize the lactobacilli strains as susceptible or resistant to each tested antibiotic. Each isolate was defined as susceptible when it was inhibited at a concentration (μ g/mL) of a specific antibiotic equal to or lower than the established cut-off value, and each isolate was defined as resistant when it was inhibited at a concentration (μ g/mL) of a specific antibiotic higher than the established cut-off value (EFSA, 2012).

Growth kinetics in MRS broth and general edible medium broth

The growth kinetics of *Lactobacillus* strains were assessed in MRS broth and in general edible medium (GEM) broth (40 g/L glucose, 30 g/L soya peptone, 7 g/L yeast extract and 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 0.01 mol/L K-phosphate buffer; pH 6.3 ± 0.2 ; Saarela et al., 2004) using two different volume scales, i.e., 200 mL and 2000 mL. Aliquots of each lactobacilli strain suspension were inoculated (1% v/v; final viable cell count of approximately 7 log CFU/mL) in MRS or GEM broth and incubated aerobically at 37 °C under stirring (150 rpm) for 48 h. At different incubation time intervals (16, 24 and 48 h),

samples were taken (1 mL) and serially diluted (10^{-1} – 10^{-5}) in sterile peptone (0.1 g/100 mL), spread plated onto MRS agar and incubated anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) at 37 °C for 48 h. After the incubation period, the viable cells were counted, and the results were expressed as the log CFU/mL.

Reproducibility and statistical analysis

All assays were performed in triplicate in two independent experiments (repetitions), and the results are expressed as the average of the tests. Statistical analyses were performed to determine significant differences ($P \leq 0.05$) among obtained results using the Student's t test or ANOVA followed by Tukey's post hoc test. These analyses were performed using Graphpad Prism 6.0 software.

RESULTS

Identification of LAB

A total of 50 isolates of LAB, comprising 10 isolates from each type of pulp fruit processing byproduct source, were randomly selected for identification (Table 1). Species belonging to *Lactobacillus* genus were the most predominant (41/50 isolates; 82%) identified LAB. In pineapple and barbados cherry pulp byproducts only a few isolates were identified as *Lactococcus lactis* (one and two isolates, respectively) and in the mango pulp byproduct, one isolate was identified as *Pediococcus pentosaceus*, and two isolates were identified as *Leuconostoc mesenteroides*. The following *Lactobacillus* species were found for each type of fruit pulp byproduct: *L. fermentum* and *L. nagelii* in pineapple pulp byproduct; *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum* and *L. nagelii* in barbados cherry pulp byproduct; *L. fermentum*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. nagelii* in

soursop pulp byproduct; *L. plantarum*, *L. pentosus* and *L. nagelii* in mango pulp byproduct; and *L. fermentum* in strawberry pulp byproduct. Considering the total number of isolates identified as belonging to *Lactobacillus* genus, the following rank for frequency of species identification was observed: *L. fermentum* > *L. plantarum*/*L. nagelii* > *L. brevis* > *L. pentosus*/*L. paracasei*/*L. casei*.

The average congruency between MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequence analysis in the identification of LAB species reached 86.1% (Table 2). Isolates of *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. lactis* and *L. mesenteroides* were identified with 100% congruency. The lowest congruency (50%) was obtained for *L. casei* and *L. paracasei*. The low identification congruency (75%) for *L. fermentum* was due to the inability of MALDI-TOF MS to identify this species beyond the genus level (*Lactobacillus* spp.). All isolates that were not identified to the species level by MALDI-TOF MS were further identified as *L. fermentum* by 16S rRNA gene sequence analysis. In this study, there was an 86% and 100% efficiency of LAB species identification by the MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene analysis techniques, respectively. Without considering the *L. casei* and *L. paracasei* isolates, which were distinctly identified in MALDI-TOF MS and 16S-rRNA gene analysis, both techniques showed similar 100% efficiency in LAB species identification.

To perform the second stage of this study, five strains identified as different *Lactobacillus* species, namely, *L. brevis* 59, *L. pentosus* 129, *L. paracasei* 108, *L. plantarum* 49 and *L. fermentum* 111, were selected for inclusion in further assays.

Tolerance to acidic conditions and bile salt concentrations

The testing of the tolerance of the *Lactobacillus* strains to different pH values revealed sharp decreases in viable counts (low survival rate) during the 3 h assessed incubation period. At pH 3.0, the tested *Lactobacillus* strains presented variable declines in viable counts over time. In this condition, *L. brevis* 59 presented the highest ($P \leq 0.05$) viable counts during the 3 h assessed incubation period (good tolerance), while *L. pentosus* 129, *L. paracasei* 108 and *L. plantarum* 111 displayed sharp decreases in viable counts after the 2 or 3 h incubation. At pH 5.0, the five tested strains survived during the 3 h incubation (good tolerance) (Table 3). In most cases, the strains displayed similar ($P > 0.05$) viable counts when cultivated in both pH 5.0 and 7.2.

Overall, the exposure to the different bile salt concentrations did not result in decreases ($P > 0.05$) in the initial viable counts of the tested *Lactobacillus* strains during the 3 h incubation (good tolerance), and no differences ($P > 0.05$) were found compared to the systems not exposed to bile salts (Table 3).

Antagonistic activity against pathogenic bacteria

The five tested *Lactobacillus* strains presented inhibitory activities against all the selected target pathogenic bacteria strains in spot agar assay, and the inhibitory effects (diameter of growth inhibition zones) varied among inhibitors and indicator strains. In the spot agar assay, the growth inhibition zone diameters displayed by the five tested *Lactobacillus* strains were ≥ 4 mm against all target pathogenic bacteria and reached ≥ 8.0 mm in most cases. Similarly, the cell-free supernatants of all *Lactobacillus* strains presented inhibitory activity against the target bacteria in the well diffusion assay with growth inhibition zone diameters varying from 1.5 to 4.5 mm. The only exceptions were the cell-free supernatants of *L. brevis* 59 and *L. fermentum* 111, which did not inhibit the growth

of *S. aureus* INCQS 00015 (Table 3). The diameters of the growth inhibition zones were always greater in spot agar assays than in well diffusion assays.

The strongest antagonistic activities in spot agar and well diffusion assays were displayed by *L. pentosus* 129 and *L. plantarum* 49. Considering the average diameter of growth inhibition zones detected by the spot agar and well diffusion assays, the following rank of sensitivity among the target foodborne pathogenic bacteria was observed: *Salmonella* Enteritidis > *Salmonella* Typhimurium > *L. monocytogenes* > *E. coli* > *S. aureus*.

Antibiotic resistance

The studied lactobacilli strains did not show resistance to ampicillin, chloramphenicol, or streptomycin, except for *L. paracasei* 108 that presented resistance to ampicillin. Three out of the five strains were resistant to gentamycin (*L. plantarum* 49, *L. paracasei* 108 and *L. pentosus* 129) and tetracycline (*L. brevis* 59, *L. paracasei* 108 and *L. fermentum* 111), and two strains were resistant to clindamycin (*L. brevis* 59 and *L. paracasei* 108). All of the strains were resistant to kanamycin and erythromycin (Table 4). Overall, the resistance profiles to antibiotics varied among the lactobacilli strains.

Growth in MRS and GEM broth

The viable counts of *Lactobacillus* strains in MRS and GEM broth at two different medium volume scales (200 and 2000 mL) during 48 h are shown in Table 5. In most cases, the viable counts were greater ($P \leq 0.05$) in MRS broth than in GEM broth during the assessed incubation period. However, the viable counts of the five strains in MRS and GEM broths were maintained at ≥ 6.7 log CFU/mL (6.7 – 7.2 CFU/mL) during the

monitored incubation period, and the viable counts were close ($P > 0.05$) to those observed at the beginning of the experiments (approx. 7 log CFU/mL). Overall, at the two different assessed MRS and GEM broth volumes, the *Lactobacillus* strains presented similar viable counts ($P > 0.05$) during the 48 h cultivation period with increasing counts up to 16 h of cultivation followed by a decline at the later assessed cultivation periods.

DISCUSSION

Recently, MALDI-TOF MS has been introduced for the identification of microorganisms, and it has been suggested as a key tool in food safety and control (Jadhav et al., 2015; Nomura, 2015). However, studies showing the performance and reproducibility of this method to identify LAB species from food sources are still scarce. It has been reported that a polyphasic strategy based on molecular techniques is necessary for accurate species designation within the LAB group (Singh et al., 2009). Thus, 16S rRNA gene sequence analysis has become a routine tool in LAB species identification (Dusková et al., 2012). In the present study, the results showed 100% congruency between MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene analysis in identification of *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. lactis* and *L. mesenteroides*, but divergence was found between the two methods for the identification of *L. casei*, *L. paracasei* and *L. fermentum*. The difficulty in the identification of *L. casei/paracasei* by MALDI-TOF MS or 16S rRNA gene sequence analysis and cross reactions for these species in PCR-based methods have already been reported (Dusková et al. 2012; Sisto et al., 2009). Angelakis et al. (2011) found discrepancy in identification of *L. paracasei* instead of *L. casei* by MALDI-TOF MS, and this discordance was explained to be probably related with the number of species (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. zeae*) forming the *L. casei* group, which cannot be

distinguished by conventional phenotypic properties (Klein et al., 1998; Holzapfel et al., 2001). Taxonomic controversies on to reject (Dicks et al., 1996) or to retain (Dellaglio et al., 2002) the species name *L. paracasei* may also difficult the denomination of a same strain. These difficulties in correct identification of lactobacilli have led to difficulties in classification of *Lactobacillus* strains (Schillinger et al., 2003).

Considering the view of the controversy on the nomenclature and taxonomy of *L. casei*-related taxa, it is possible that isolates assigned to *L. casei* should actually be classified as *L. paracasei* (Sisto et al., 2009; Dusková et al., 2012). Another interesting finding in the present study was the genus-level identification (*Lactobacillus* spp.) by MALDI-TOF MS of seven isolates, which were further assigned by 16S rRNA gene sequence analysis as *L. fermentum*. An earlier study observed similar results and reported a MALDI-TOF MS log (score) indicating probable genus identification for one *Lactobacillus* strain, which was further assigned by PCR as *L. fermentum* (Dusková et al., 2012). Thus, the discriminatory inability of MALDI-TOF MS to identify species of some *Lactobacillus* strains, which were further identified as *L. fermentum* by 16S rRNA gene analysis, suggests that clarification of MALDI-TOF MS outputs using well-known molecular techniques is still required.

The observed prevalence of *Lactobacillus* species in the autochthonous LAB microbiota of fruit pulp processing byproducts has already been reported for raw fruit and vegetables (Vitali et al., 2012; Argyri et al., 2013). Although the epiphytic microbial population of plants is largely subjected to fluctuations of physicochemical and nutritional conditions, each fruit and vegetable harbors a dominant and constant microbiota (Yang et al., 2000; Dukosvá et al., 2015). Supporting our data, *L. plantarum*,

L. brevis, *L. fermentum* and *L. paracasei* are cited among the most frequent lactobacilli isolated from fruit and vegetables (Vitali et al., 2009; Argyri et al., 2013).

In vitro studies of tolerance to harsh acidic conditions and bile contents normally found in the stomach and upper parts of the intestine, respectively, together with the capability to inhibit pathogenic bacteria, have been successfully used to select potentially probiotic LAB (Mättö et al., 2006; Tuo et al., 2013). In the present study, none of the five selected *Lactobacillus* strains (*L. brevis* 59, *L. pentosus* 129, *L. paracasei* 108, *L. plantarum* 49 and *L. fermentum* 111) survived at pH 2.0 after 2 h of exposure. The tolerance assays at pH 3.0 revealed a clear separation of a group composed of three strains (*L. brevis* 59, *L. pentosus* 129 and *L. fermentum* 111) that presented good tolerance and another group of two strains (*L. paracasei* 108 and *L. plantarum* 49) that showed a sharp loss of cell viability after 2 h of exposure. In agreement with these results, some studies have verified that the capability of different *Lactobacillus* strains to maintain cell viability varies greatly between pH 2.0 and 3.0 (Jacobsen et al., 1999; Monteagudo-Mera et al., 2012). In the stomach, probiotic strains do not necessarily encounter as low pH as 2.0 because the environment can be buffered by various food components, increasing the gastric pH (Zarate et al., 2000). Components of gastric juice may also confer some protective effect on bacterial cell viability (Conway et al., 1987). In this sense, the survival of probiotic strains during gastric transit depends on both their intrinsic tolerance to the hostile conditions found therein and the food matrix harboring them.

The studied *Lactobacillus* strains presented good tolerance to 0.15, 0.30 and 1.00% bile salt concentrations with no delay in growth. Bile tolerance is an important characteristic in *Lactobacillus* species enabling them to survive, metabolize and grow

during the gastrointestinal transit as well as to exert their beneficial effects on the host (Charteris et al., 1998; Argyri et al., 2013). Interestingly, some studies have found a relationship between high bile salt tolerance and the capability to hydrolyze bile salts in *Lactobacillus* strains (Sridevi et al., 2009; Argyri et al., 2013), and this later property has been correlated to cholesterol lowering effects (Begley et al., 2006).

The five tested *Lactobacillus* strains displayed the capability to inhibit pathogenic bacteria, including *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium and *S. aureus*, in the spot agar and/or well diffusion assays, but the nature of the inhibitory substance(s) remains unknown. The capability to produce antimicrobial compounds, such as organic acids, short chain fatty acids and bacteriocins, is one of the functional properties used to characterize probiotics (Argyri et al., 2013). The production of some metabolites with antimicrobial properties by probiotic bacteria can be beneficial for food preservation and the prevention of the growth of foodborne pathogens (Monteagudo-Mera et al., 2012).

Among the required properties by which specific strains can be considered as potential probiotics is that they do not harbor acquired and transferable (added genes) antibiotic resistances (EFSA, 2012; Gueimonde et al., 2013). The resistance of all five strains to erythromycin and kanamycin, as well as the resistance of two strains to clindamycin, are of concern. Resistance to tetracycline or gentamycin was also observed for three strains. The nature of the resistance warrants further studies before any of the resistant strains can be considered safe for human use.

Studies of the growth behavior of the selected *Lactobacillus* strains revealed a repeatedly similar growth pattern in both MRS and GEM broths. The similar growth behavior of the strains in MRS broth, a well-known expensive laboratory medium for

Lactobacillus cultivation, and in GEM broth, an inexpensive media containing only food-grade ingredients (Saarela et al., 2006; Pimentel et al., 2012), is noteworthy. Particularly, the verified growth behavior in GEM broth encourages further studies for scale-up and optimization of the production of highly concentrated forms of the tested *Lactobacillus* strains in this medium for possible direct vat applications (as highly concentrated frozen cultures or as freeze-dried cultures) in formulations.

In conclusion, the results of this study showed that the LAB forming the microbiota of the studied fruit pulp processing byproducts mostly belonged to the *Lactobacillus* genus and included the *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. nagelii*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. paracasei* and *L. casei* species. MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequence analysis revealed high congruency of LAB species identification. Overall, the selected *Lactobacillus* strains revealed the following desirable probiotic-related properties: tolerance to different acidic conditions and bile salt concentrations; good growth in both laboratory and edible growth media; and capacity to inhibit distinct pathogenic bacteria despite their variable susceptibility to different antibiotics. Thus, these data suggested that most of the assessed *Lactobacillus* strains are good candidates for further studies including fermentation and technological characteristics, survival in different food matrices and impacts on quality characteristics, as well as for *in vivo* studies to verify their potential health benefits. Finally, fruit pulp processing byproducts may be considered potential sources of *Lactobacillus* strains possessing interesting probiotic-related properties.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: EL de Souza, M Saarela. Performed the experiments: EFG, WAL, DEX, WCAC, KSO, MAMJ, BTLL, RCP, OLF. Analyzed the data: ELS, BTLL, EFG, MM, MS. Drafted the paper: ELS, EFG, MM, MS.

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).

REFERENCES

- Ajila, C.M., Bhat, S.G., Rao, and U.J.S.P. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chem.* 102, 1006–1011. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.036>.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403–410. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid Res.* 25, 3389–3402. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- American Public Health (APHA). (2015). Compendium for the microbiological examination of foods. American Public Health, Washington D.C.
- Angelakis, E., Million, M., Henry, M. and Raoult, D. (2011). Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass

- Spectrometry. *Journal of Food Science*, 76, 568-572. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02369.x>
- Araújo, K.L.G.V., Magnani M., Nascimento, J.A., Souza, A.L., Epaminondas, P.S., Souza, A.L., Queiroz, N., and Souza, A.G. (2014). Antioxidant activity of co-products from guava, mango and barbados cherry produced in the Brazilian Northeast. *Molecules*. 19, 3110-3119. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19033110>.
- Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E., Paganou, E.Z., and Tassou, C.C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* 33, 282-291. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>.
- Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., and González-Aguilar, G.A. (2010). Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: Looking for integral exploitation. *J. Food Sci.* 25, 175–181. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01792.x>
- Ayala-Zavala, J.F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J.A., Siddiqui, Md. W., Dávila-Aviña, J.E., and González-Aguilar, G.A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Res. Int.* 44, 1866–1874. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.021>.
- Begley, M., Hill, C., and Cahan, C.G. (2006). Bile salts hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1729 – 1738. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.3.1729–1738.2006>.
- Bizzini, A., Jatón, K., Romo, D., Bille, J., Prod'hom, G. and Greub, G. (2011). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry as an

- Alternative to 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Difficult-To-Identify Bacterial Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 693–696. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01463-10>.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., and Collins, J.K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* 61, 1636-1643.
- CLSI. Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement., 2012. CLSI document M100-22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, pp.151.
- Conway, P.L., Gorbach, M.S.I., and Goldin, B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70, 1-12.
- Danielsen, M. (2002). Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Plasmid.* 48, 98-103. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-619X\(02\)00118-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-619X(02)00118-X)
- Dellaglio, F., Felis, G.E., Torriani, S. (2002). The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 285–7.
- Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C.G., Ricciuti, P., and Gobbetti, M. (2010a). 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. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.011>.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., De Angelis, M., and Gobbetti, M. (2011a). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties

- of red and green smoothies. *Food Microbiol.* 28, 1062-1071. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.011>.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., Lovino, R., Servili, M., Taticchi, A., Urbani, S., and Gobbetti, M. (2011b). Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 28, 900-909. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.008>.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Sgarbi, E., Lazzi, C., Bernini, V., Neviani, E., and Gobbetti, M. (2010b). Comparison of phenotypic (Biolog System) and genotypic (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR, and amplified fragment length polymorphism, AFLP) methods for typing *Lactobacillus plantarum* isolates from raw vegetables and fruits. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 246-253. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.018>.
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J.C., Buchin, S., De Gara, L., and Gobbetti, M. (2008b). Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 473-483. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.017>.
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L., and Gobbetti, M. (2008a). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 220-228. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.010>.
- Dicks, L.M., Du Plessis, E.M., Dellaglio, F., and Lauer, E. (1996). Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L.*

- casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int. J. System. Bacteriol.* 46, 337-340.
- Dusková, M., Sedo, O., Kšicová, K., Zdrahál, Z., and Karpísková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *Int. J. Food Microbiol.* 159, 107-114. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029>.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2012. Scientific Opinion. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 10, 2740.
- FAO/WHO. 2006. Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutritional Paper, pp.85.
- Freiwald, A., and Sauer, S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 4, 732–742. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.37>.
- García-Ruiz, A., de Llano, D.G., Esteban-Fernandez, A., Requena, T., Bartolome, B., and Moreno-Arribas, M.V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiol.* 44, 220-225. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.015>.
- 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., and Swings, J. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 733-739. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1236>
- Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G., and Swings, J. (2003). Molecular characterization of tet (M) genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry

- sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1270-1275.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.2.1270-1275.2003>
- Gueimonde, M., Sánchez, B.G., de Los Reyes-Gavilán, C., and Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.* 18, 202. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>.
- Guo, X.H., Kim, J.M., Nam, H.M., Park, S.Y., and Kim, J.M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe.* 16, 321-326. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.03.006>.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*, 73, 365S-73.
- Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, Sandström, B., Tvede, M., and Lakobsen, 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.
- Jadhav, S., Gulati, V., Fox, E.M., Karpe, A., Beale, D.J., Sevier, D., Bhawe, M., and Palombo, E.A. (2015). Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int. J. Food Microbiol.* 202, 1-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.023>.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 103–25. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00049-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00049-X).

- Mättö, J., Alakomi, H.-L., Virkajärvi, I., and Saarela, M. (2006). Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* sbsp. lactis functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *Int. Dairy J.* 16, 1029-1037. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.014>.
- Monteagudo-Mera, A, Rodrigues-Aparício, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M.R., and 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. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.014>.
- Naeem, M., Ilyas, M., Haider, S., Baig, S., and 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.
- Nomura, F. (2015). Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochem. Biophysic. Acta.* 1854, 528 – 537. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.10.022>.
- Peres, C.M., Peres, C., Hernández-Mendoza, A., and Malcata, F.X. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - With an emphasis on table olives. *Trends Food Sci. Technol.* 26, 31–42. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.006>.
- Pimentel, L.L., Mättö, J., Malcata, F.X., Pintado, M.E., and Saarela, M. (2012). Survival of potentially probiotic enterococci in dairy matrices and in the human gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* 27, 53-57. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.07.008>.

- Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K., and Adams, M.C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* 43, 1–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>.
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., de Brito, E.S., Perez-Jimenez, J., Saura-Calixto, F., and Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem.* 121, 996–1002. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>.
- Saarela, M., Rantala, M., Hallamaa, K., Nohynek, L., Virkajärvi, I., and Mättö, J. (2004). Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1205–1214. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02286.x>
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Alakomi, H.-L., Sigvart-Mattila, P., Mättö, J., 2006. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *Int. Dairy J.* 16, 1477–1482. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.007>.
- Schillinger, U., Yousif, N.M., Sesar, L., Franz, C.M. (2003). Use of group-specific and RAPD-PCR analyses for rapid differentiation of *Lactobacillus* strains from probiotic yogurts. *Curr Microbiol*, 47, 453–456. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-003-4067-8>.
- Silva, L.M.R., Figueiredo, E.A.T., Ricardo, N.M.P.S., Vieira, I.G.P., Figueiredo, R.W., Brasil, I.M., and Gomes, C.L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chem.* 143, 398–404. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.001>.
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R., and Heller, K.J. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely

- related species: a review. *LWT – Food Sci. Technol.* 42, 448-457. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.019>.
- Sisto, A., De Bellis, P., Visconti, A., Morelli, L., and Lavermicocca, P., 2009. Development of a PCR assay for the strain-specific identification of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1. *Int. J. Food Microbiol.* 136, 59–65. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.017>.
- Sridev, N., Vishwe, P., and Prabhune, A. (2009). Hypocholesterolemic effect of bile salt hydrolase from *Lactobacillus buchneri* ATCC 4005. *Food Res. Int.* 42, 516-520. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.016>
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., and Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 1-10. doi: [10.1016/S0168-1605\(02\)00162-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00162-9)
- Tuo, Y., Zhang, W., Zhang, L., Ai, L., Zhang, Y., and Han, X. (2013). Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus* strains. *Anaerobe.* 21, 22-27. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.03.007>.
- Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C.G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., Gobbetti, M., and Di Cagno, R. (2012). Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiol.* 31, 116-125. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.027>
- Yang, C.H., Crowley, D.E., Borneman, J., and Keen, N.T. (2000). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Microb. Ecol.* 98, 3889-3894. doi: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.051633898>.

- Yang, J., Cao, Y., Cai, Y., and Terada, F. (2010). Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *J. Dairy Sci.* 93, 3136–3145. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2898>.
- Zarate, G., Chaia, A.P., Gonzalez, S., and Oliver, G. (2000). Viability of beta-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J. Food Prot.* 63, 1214-1221.
- Welker, M. 2011. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics* 11, 3143–3153. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201100049>.

TABLE 1 | Identification of lactic acid bacteria isolates from different fruit pulp processing byproducts (total number of isolates from each source, technique applied for identification and number of isolates identified by each applied identification technique).

By-product source	Total number of isolates	Identification technique			
		MALDI-TOF	Number of identified isolates	16S gene	Number of identified isolates
Pineapple	10	<i>L. fermentum</i>	6	<i>L. fermentum</i>	9
		<i>L. lactis</i>	1	<i>L. lactis</i>	1
		<i>L. nagelii</i>	1	-	0
		<i>Lactobacillus</i> spp.	2	-	0
Barbados cherry	10	<i>L. plantarum</i>	3	<i>L. plantarum</i>	3
		<i>L. fermentum</i>	2	<i>L. fermentum</i>	2
		<i>L. brevis</i>	2	<i>L. brevis</i>	2
		<i>L. nagelii</i>	1	<i>L. nagelii</i>	1
		<i>L. lactis</i>	2	<i>L. lactis</i>	2
Soursop	10	<i>Lactobacillus</i> spp.	2	<i>Lactobacillus</i> spp.	0
		<i>L. paracasei</i>	2	<i>L. paracasei</i>	1
		<i>L. nagelii</i>	4	<i>L. nagelii</i>	4
		<i>L. fermentum</i>	2	<i>L. fermentum</i>	2
		-	-	<i>L. casei</i>	1
Mango	10	<i>L. pentosus</i>	1	<i>L. pentosus</i>	1
		<i>L. mesenteroides</i>	3	<i>L. mesenteroides</i>	3
		<i>P. pentosaceus</i>	1	<i>P. pentosaceus</i>	1
		<i>L. fermentum</i>	1	<i>L. fermentum</i>	1
		<i>L. nagelii</i>	1	<i>L. nagelii</i>	1
		<i>L. plantarum</i>	3	<i>L. plantarum</i>	3
Strawberry	10	<i>L. fermentum</i>	7	<i>L. fermentum</i>	10
		<i>Lactobacillus</i> spp.	3	-	0

(-): genera/species that was not identified by the technique.

TABLE 2 | Number of identified lactic acid species from fruit pulp processing byproducts according to each applied identification technique and congruency of identification between the applied identification techniques.

Genera/species of lactic acid bacteria	Number of strains identified by MALDI-TOF	Number of strains identified by 16S gene	% Congruency
<i>L. fermentum</i>	18	24	75
<i>L. plantarum</i>	6	6	100
<i>L. brevis</i>	2	2	100
<i>L. nagelii</i>	7	6	86
<i>L. paracasei</i>	2	1	50
<i>L. casei</i>	0	1	50
<i>L. pentosus</i>	1	1	100
<i>L. lactis</i>	3	3	100
<i>L. mesenteroides</i>	3	3	100
<i>P. pentosaceus</i>	1	1	100

TABLE 3 | Viable cell counts (n = 3, mean values $\pm$ standard deviation; log CFU/g) of different lactobacilli strains from pulp fruit processing byproducts when challenged with different pH values and bile salt concentrations for different exposure time periods and antagonistic activities, as expressed in diameter (mm) of growth inhibition zones ($\pm$ standard deviation), toward pathogenic bacteria as measured by spot agar and well diffusion assays.

Strains	pH values			pH 2.0			pH 3.0			pH 5.0		
	Control (pH 7.2)			Exposure time (h)			Exposure time (h)			Exposure time (h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>L. brevis</i> 59	7.5($\pm$ 0.2) ^{Ab}	7.5($\pm$ 0.3) ^{Ac}	7.4($\pm$ 0.3) ^{Ac}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	7.5($\pm$ 0.2) ^{Bd}	7.2($\pm$ 0.1) ^{Bc}	6.4($\pm$ 0.4) ^{Ac}	7.4($\pm$ 0.2) ^{Bb}	7.2($\pm$ 0.3) ^{Bc}	6.1($\pm$ 0.1) ^{Ab}
<i>L. pentosus</i> 129	6.9($\pm$ 0.3) ^{Aa}	6.5($\pm$ 0.3) ^{Aa}	6.7($\pm$ 0.2) ^{Ba}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	6.1($\pm$ 0.2) ^{Ca}	4.1($\pm$ 0.7) ^{Ba}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	6.5($\pm$ 0.7) ^{Ca}	5.8($\pm$ 0.2) ^{Aa}	5.7($\pm$ 0.0) ^{Aa}
<i>L. paracasei</i> 108	7.1($\pm$ 0.3) ^{Ab}	7.3($\pm$ 0.2) ^{Ac}	7.2($\pm$ 0.2) ^{Abc}	3.7($\pm$ 0.1) ^{Bb}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	3.7($\pm$ 0.2) ^{Ba}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	7.3($\pm$ 0.3) ^{Ab}	7.1($\pm$ 0.2) ^{Ac}	6.9($\pm$ 0.2) ^{Ac}
<i>L. plantarum</i> 49	6.8($\pm$ 0.1) ^{Ab}	6.6($\pm$ 0.2) ^{Ab}	6.7($\pm$ 0.1) ^{Ab}	6.7($\pm$ 0.1) ^{Bd}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	6.7($\pm$ 0.1) ^{Bc}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	7.2($\pm$ 0.1) ^{Bb}	6.5($\pm$ 0.2) ^{Ab}	6.0($\pm$ 0.2) ^{Ab}
<i>L. fermentum</i> 111	6.8($\pm$ 0.1) ^{Aa}	6.4($\pm$ 0.2) ^{Aa}	6.3($\pm$ 0.2) ^{Aa}	6.1($\pm$ 0.2) ^{Bc}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	<2($\pm$ 0.0) ^{Aa}	6.3($\pm$ 0.3) ^{Ab}	6.3($\pm$ 0.0) ^{Ab}	6.4($\pm$ 0.3) ^{Ab}	6.7($\pm$ 0.3) ^{Aa}	6.3($\pm$ 0.3) ^{Ab}	6.1($\pm$ 0.2) ^{Ad}
Strains	Bile salts (concentration - %)			0.15%			0.30%			1.00%		
	Control (0.00%)			Exposure time (h)			Exposure time (h)			Exposure time (h)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>L. brevis</i> 59	7.2($\pm$ 0.1) ^{Ad}	6.8($\pm$ 0.2) ^{Ab}	7.1($\pm$ 0.2) ^{Ab}	7.2($\pm$ 0.3) ^{Ac}	7.1($\pm$ 0.3) ^{Ab}	6.8($\pm$ 0.1) ^{Ab}	7.0($\pm$ 0.3) ^{Ab}	7.2($\pm$ 0.1) ^{Ab}	7.2($\pm$ 0.2) ^{Ab}	7.6($\pm$ 0.1) ^{Ab}	7.3($\pm$ 0.1) ^{Aa}	7.4($\pm$ 0.2) ^{Ab}
<i>L. pentosus</i> 129	7.1($\pm$ 0.1) ^{Ac}	7.2($\pm$ 0.2) ^{Ab}	7.5($\pm$ 0.3) ^{Ab}	7.1($\pm$ 0.2) ^{Ac}	7.0($\pm$ 0.3) ^{Ab}	6.9($\pm$ 0.2) ^{Ab}	7.1($\pm$ 0.1) ^{Ab}	7.1($\pm$ 0.2) ^{Ab}	6.9($\pm$ 0.3) ^{Ab}	7.1($\pm$ 0.1) ^{Aa}	7.2($\pm$ 0.2) ^{Aa}	7.0($\pm$ 0.2) ^{Aa}
<i>L. paracasei</i> 108	6.8($\pm$ 0.1) ^{Aa}	7.1($\pm$ 0.1) ^{Ba}	7.3($\pm$ 0.2) ^{Cb}	6.8($\pm$ 0.2) ^{Ab}	6.4($\pm$ 0.0) ^{Aa}	6.2($\pm$ 0.2) ^{Ab}	6.8($\pm$ 0.4) ^{Aa}	7.0($\pm$ 0.3) ^{Ab}	7.2($\pm$ 0.2) ^{Ab}	7.0($\pm$ 0.1) ^{Aa}	6.9($\pm$ 0.2) ^{Aa}	7.1($\pm$ 0.1) ^{Aa}
<i>L. plantarum</i> 49	7.1($\pm$ 0.1) ^{Ac}	7.0($\pm$ 0.1) ^{Ab}	7.3($\pm$ 0.1) ^{Aa}	7.0($\pm$ 0.1) ^{Ac}	7.2($\pm$ 0.1) ^{Ab}	7.1($\pm$ 0.2) ^{Ac}	7.1($\pm$ 0.2) ^{Ab}	7.0($\pm$ 0.1) ^{Aa}	7.1($\pm$ 0.1) ^{Ab}	7.1($\pm$ 0.2) ^{Aa}	7.2($\pm$ 0.3) ^{Aa}	6.8($\pm$ 0.3) ^{Aa}
<i>L. fermentum</i> 111	6.9($\pm$ 0.2) ^{Ab}	7.2($\pm$ 0.3) ^{Aa}	7.4($\pm$ 0.3) ^{Aa}	6.8($\pm$ 0.3) ^{Aa}	6.7($\pm$ 0.3) ^{Aa}	6.9($\pm$ 0.3) ^{Ba}	7.2($\pm$ 0.1) ^{Ab}	6.9($\pm$ 0.1) ^{Ab}	6.8($\pm$ 0.3) ^{Aa}	6.8($\pm$ 0.2) ^{Aa}	6.9($\pm$ 0.1) ^{Aa}	6.7($\pm$ 0.2) ^{Aa}
Inhibitory strain	Antagonistic activity											
	Indicator strain											
	<i>S. aureus</i> INCQS 00015		<i>S. typhi</i> INCQS 00150		<i>S. enteritidis</i> INCQS 00258		<i>L. monocytogenes</i> INCQS 00266		<i>E. coli</i> INCQS 00219			
	Spot agar	Well diffusion	Spot agar	Well diffusion	Spot agar	Well diffusion	Spot agar	Well diffusion	Spot agar	Well diffusion	Spot agar	Well diffusion
<i>L. brevis</i> 59	4.0($\pm$ 1.0) ^a	<1($\pm$ 0.0) ^a	6.0($\pm$ 0.7) ^a	2.0($\pm$ 0.3) ^a	5.0($\pm$ 1.0) ^a	1.5($\pm$ 0.3) ^a	4.0($\pm$ 0.5) ^a	2.5($\pm$ 0.3) ^a	4.5($\pm$ 1.0) ^a	2.0($\pm$ 0.3) ^a		
<i>L. pentosus</i> 129	7.0($\pm$ 0.9) ^d	4.0($\pm$ 0.5) ^c	8.5($\pm$ 0.5) ^c	2.5($\pm$ 0.4) ^{abc}	10.5($\pm$ 1.0) ^c	3.0($\pm$ 0.5) ^b	8.0($\pm$ 1.0) ^c	4.0($\pm$ 0.5) ^b	6.5($\pm$ 0.8) ^b	4.5($\pm$ 0.5) ^c		
<i>L. paracasei</i> 108	7.0($\pm$ 1.0) ^d	<1($\pm$ 0.0) ^a	8.0($\pm$ 0.4) ^{bc}	3.0($\pm$ 0.5) ^{bc}	8.3($\pm$ 0.6) ^b	3.0($\pm$ 0.5) ^b	8.0($\pm$ 0.7) ^c	2.0($\pm$ 0.5) ^a	8.5($\pm$ 1.0) ^c	4.0($\pm$ 0.7) ^c		
<i>L. plantarum</i> 49	9.0($\pm$ 0.5) ^c	2.8($\pm$ 0.5) ^b	7.5($\pm$ 0.5) ^b	2.5($\pm$ 0.3) ^{ab}	10.8($\pm$ 1.0) ^c	3.5($\pm$ 0.3) ^b	8.2($\pm$ 0.8) ^c	3.0($\pm$ 0.8) ^{ab}	5.3($\pm$ 0.6) ^a	3.0($\pm$ 0.5) ^b		
<i>L. fermentum</i> 111	5.0($\pm$ 1.0) ^b	<1($\pm$ 0.0) ^a	6.7($\pm$ 0.6) ^{ab}	2.0($\pm$ 0.5) ^a	8.5($\pm$ 0.5) ^b	3.0($\pm$ 0.6) ^b	6.0($\pm$ 1.0) ^b	2.0($\pm$ 0.5) ^a	6.0($\pm$ 0.5) ^{ab}	1.5($\pm$ 0.3) ^a		

^{A-B}: different superscript capital letters in the same row denote differences ($P \leq 0.05$) in counts obtained in each assayed stress condition (pH value or bile salt concentration) for each tested lactic acid bacteria based on T test; ^{a-d}: different superscript small letters in the same column denote differences ($P \leq 0.05$) for the different tested lactic acid bacteria based on Tukey's test.

TABLE 4 | MIC of different antibiotics against different lactobacilli strains from pulp fruit processing byproducts.

Strains	Antibiotics							
	ampicillin	chloramphenicol	clindamycin	erythromycin	gentamycin	kanamycin	streptomycin	tetracycline
<i>L. brevis</i> 59	2 ^S	2 ^S	32 ^R	512 ^R	16 ^S	256 ^R	16 ^S	512 ^R
<i>L. pentosus</i> 129	2 ^S	2 ^S	1 ^S	512 ^R	64 ^R	128 ^R	64 ^S	256 ^S
<i>L. paracasei</i> 108	64 ^R	2 ^S	64 ^R	512 ^R	64 ^R	256 ^R	64 ^S	512 ^R
<i>L. plantarum</i> 49	2 ^S	2 ^S	1 ^S	512 ^R	64 ^R	128 ^R	64 ^S	512 ^S
<i>L. fermentum</i>	1 ^S	2 ^S	1 ^S	256 ^R	8 ^S	256 ^R	16 ^S	512 ^R

111
Resistant ^(R) or Sensitive ^(S) profile according to the cut-offs recommended by EFSA (2012).

TABLE 5 | Viable cell counts (n = 3, mean values $\pm$ standard deviation; log CFU/g) of lactobacilli isolates from pulp fruit byproducts when cultivated in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) and in general edible medium (GEM) broths at low-scale (200 mL) and medium-scale (2000 mL) volumes at 37 °C during 48 h (initial viable cell counts of approx. 7 log CFU/mL).

Strain	Time of cultivation (h)	Cultivation media (volume)			
		MRS (200 mL)	GEM (200 mL)	MRS (2000 mL)	GEM (2000 mL)
<i>L. plantarum</i> 149	16	8.5($\pm$ 0.3) ^{Bb}	7.8($\pm$ 0.2) ^{Ba}	8.1($\pm$ 0.2) ^{Ba}	8.2($\pm$ 0.2) ^{Ba}
	24	8.3($\pm$ 0.2) ^{Bb*}	7.7($\pm$ 0.3) ^{Ba}	7.4($\pm$ 0.3) ^{Aa*}	7.8($\pm$ 0.1) ^{Aa}
	48	7.6($\pm$ 0.3) ^{Ab}	6.9($\pm$ 0.3) ^{Aa*}	7.1($\pm$ 0.2) ^{Aa}	7.5($\pm$ 0.2) ^{Aa*}
<i>L. brevis</i> 59	16	8.2($\pm$ 0.3) ^{Bb}	7.5($\pm$ 0.3) ^{Aa}	8.5($\pm$ 0.1) ^{Bb}	7.9($\pm$ 0.1) ^{Ba}
	24	8.6($\pm$ 0.2) ^{Bb}	7.6($\pm$ 0.2) ^{Aa}	8.3($\pm$ 0.2) ^{Bb}	7.4($\pm$ 0.3) ^{Aa}
	48	7.4($\pm$ 0.3) ^{Ab}	6.5($\pm$ 0.3) ^{Ba*}	7.2($\pm$ 0.3) ^{Aa}	7.3($\pm$ 0.2) ^{Aa*}
<i>L. paracasei</i> 108	16	7.9($\pm$ 0.2) ^{Ba}	7.7($\pm$ 0.2) ^{Ba}	8.6($\pm$ 0.1) ^{Cb}	7.8($\pm$ 0.1) ^{Ca}
	24	8.4($\pm$ 0.3) ^{Bb}	7.6($\pm$ 0.2) ^{Ba}	8.1($\pm$ 0.1) ^{Bb}	7.4($\pm$ 0.2) ^{Ba}
	48	7.3($\pm$ 0.3) ^{Aa}	7.1($\pm$ 0.3) ^{Aa}	7.4($\pm$ 0.4) ^{Ab}	6.8($\pm$ 0.2) ^{Aa}
<i>L. fermentum</i> 111	16	8.4($\pm$ 0.2) ^{Ba}	8.3($\pm$ 0.1) ^{Ba}	8.0($\pm$ 0.1) ^{Ba}	8.4($\pm$ 0.3) ^{Ca}
	24	8.1($\pm$ 0.3) ^{Ab*}	8.0($\pm$ 0.2) ^{Ba}	7.4($\pm$ 0.3) ^{Aa*}	8.1($\pm$ 0.2) ^{Bb}
	48	7.6($\pm$ 0.3) ^{Aa}	7.2($\pm$ 0.2) ^{Aa}	6.8($\pm$ 0.3) ^{Aa}	7.6($\pm$ 0.2) ^{Ab}
<i>L. pentosus</i> 129	16	8.2($\pm$ 0.3) ^{Ab}	7.7($\pm$ 0.2) ^{Ba}	8.2($\pm$ 0.1) ^{Bb}	7.9($\pm$ 0.2) ^{Ba}
	24	8.6($\pm$ 0.2) ^{Ab*}	7.4($\pm$ 0.3) ^{Ba}	7.8($\pm$ 0.2) ^{Aa*}	7.4($\pm$ 0.3) ^{ABa}
	48	7.4($\pm$ 0.3) ^{Ab*}	6.8($\pm$ 0.3) ^{Aa}	7.7($\pm$ 0.3) ^{Ab*}	6.9($\pm$ 0.3) ^{Aa}

^{A - C}: different superscript capital letters in the same row denote differences ($P \leq 0.05$) in counts obtained in different cultivation media and volume or in the same cultivation media but with different volumes based on Student's t test; ^{a - b}: different superscript small letters in the same column for the same cultivation media and volume denote differences ($P \leq 0.05$) in counts obtained for each lactic acid bacteria based on Student's t test; *: denotes differences ($P \leq 0.05$) in counts of the same lactic acid bacteria cultivated in the same broth but in low- and medium-scale volumes based on Student's t test.

4.2 ARTIGO 2

THE SURVIVAL OF FIVE FRUIT-DERIVED AND FREEZE-DRIED LACTOBACILLUS STRAINS IN APPLE, ORANGE AND GRAPE JUICES

Submetido ao periódico: Food microbiology

The survival of five fruit-derived and freeze-dried *Lactobacillus* strains in apple, orange and grape juices

Running title: Survival of lactobacilli in fruit juices

Abstract

This study assessed the survival of the fruit-derived and freeze-dried *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 and *L. pentosus* 129 strains during frozen storage and when incorporated into apple, orange and grape juice stored under refrigeration. The physicochemical parameters of juices containing the freeze-dried *Lactobacillus* strains and the survival of the test strains in the fruit juices during *in vitro* digestion were evaluated. No decreases in survival rates of the freeze-dried cells were observed up to 1 month of storage. The survival rates of the freeze-dried strains *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 were >0.75 up to 4 months of storage. All freeze-dried strains exhibited survival rates of >0.75 up to 2 weeks of storage in apple juice; only *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 showed similar survival rates in orange and grape juices up to 2 weeks of storage. The contents of the monitored organic acids or sugars during storage varied depending on the added strain and the type of fruit juice. The survival in fruit juices during the *in vitro* digestion varied among the tested *Lactobacillus* strains. At the end of the *in vitro* digestion, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108 and *L. fermentum* 111 showed survival rates of >0.80 in apple juice.

Keywords: *Lactobacillus* spp., freeze-drying, survival, juices, quality parameters.

1. Introduction

Fruit juices are considered suitable matrices for the incorporation of probiotics since they are ideal for consumers who are interested in low cholesterol foods, suffer from lactose intolerance and/or are vegetarian (Alves et al., 2016). The primary challenge for the development of probiotic juices is to maintain the survival of the probiotic strains during the manufacture and storage of the product (Nualkaekul et al., 2011; Nualkaekul et al., 2012). The low pH and the presence of phenolics have been cited as the primary factors associated with the low survival rates of probiotics in fruit juices (Nualkaekul and Charalampopoulos, 2011; Nualkaekul et al., 2011). However, previous studies have reported that survival of probiotic strains in fruit juices may be enhanced by naturally occurring juice constituents (e.g., fibres, minerals and vitamins) (Costa et al., 2017; Ding and Shah, 2008; Sheehan et al., 2007), as well as by microencapsulation techniques that protect the probiotics from adverse conditions (Martín et al., 2015).

Fruit and their industrial processing byproducts have been considered potential sources for lactic acid bacteria with the required features for probiotic strains (Di Cagno et al., 2016). Lactic acid bacteria isolated from these sources may be better adapted to low pH conditions (Vitali et al., 2012), which may help them survive in fruit-based formulations as well as the human gastrointestinal tract (Garcia et al., 2016). Different *Lactobacillus* species have been isolated from a variety of fruit and their industrial processing byproducts (e.g., *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. nagelii*, *L. plantarum*, *L. pentosus* and *L. brevis*) (Argyri et al., 2013; Di Cagno et al., 2008; Di Cagno et al., 2010; Di Cagno et al., 2011; Garcia et al., 2016; Vitali et al., 2012) and have shown satisfactory performances in assays for probiotic properties (Argyri et al., 2013; Garcia et al., 2016; Vitali et al., 2012). *Lactobacillus* species have been intensively studied for their potential use in functional foods (Argyri et al., 2013; Champagne et al., 2011; Duarte et al., 2017; Garcia et al., 2016).

Typically, probiotic cultures are freeze-dried to produce powders with prolonged storage stabilities (Saarela et al., 2006a; 2006b). Variations in the abilities of different probiotic freeze-dried *Lactobacillus* species (e.g., *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei* and *L. rhamnosus*) to survive during frozen storage or when incorporated into fruit juices have been reported (Costa et al., 2017; Espírito-Santo et al., 2015; Nualkaekul et al., 2012; Nualkaekul et al., 2011; Champagne et al., 2008). Most of these studies have focused on the use of commercially available strains or strains of human or dairy origin. In contrast, studies on the survival of freeze-dried cells of fruit-derived *Lactobacillus* strains in fruit juices are scarce.

This study assessed the survival of five fruit-derived and freeze-dried *Lactobacillus* strains during frozen storage, as well as when incorporated into apple, grape and orange juices stored under refrigerated conditions. The physicochemical parameters of the fruit juices containing the freeze-dried *Lactobacillus* strains during refrigerated conditions, and the survival of the test strains in fruit juices during *in vitro* digestion were evaluated.

2. Materials and methods

2.1 Test strains

Five strains of different *Lactobacillus* species that were isolated from industrial fruit pulp processing byproducts were used in this study: *L. plantarum* 49 and *L. brevis* 59 were isolated from byproducts of *Malpighia glabra* L. (Barbados cherry); *L. paracasei* 108 and *L. fermentum* 111 were isolated from byproducts of *Annona muricata* L. (soursop); and *L. pentosus* 129 was isolated from byproducts of *Mangifera indica* L. (mango). These strains were selected based on their performance in *in vitro* tests for probiotic properties (Garcia et al., 2016). Stock cultures were stored at -20 °C in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

(HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA; 20 mL/100 mL). Working cultures were maintained aerobically on MRS agar (HiMedia, Mumbai, India) at 4 °C and were transferred to new media monthly (Albuquerque et al., 2017).

2.2 Freeze-drying and survival of Lactobacillus cells during frozen storage

The *Lactobacillus* cells were freeze-dried following procedures previously described by Saarela et al. (2006a), with minor adaptations. Aliquots of working cultures of the five assayed *Lactobacillus* strains were plated onto MRS agar and incubated anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK) at 37 °C for 24 h. Next, a single colony of each strain was transferred to MRS broth, incubated anaerobically at 37 °C for 24 h, and then 4 mL of the culture was used to inoculate 200 mL of fresh general edible medium (GEM; 40 g/L glucose, 30 g/L soy peptone, 7 g/L yeast extract and 1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and incubated anaerobically at 37 °C for 24 h. Subsequently, 2 L of fresh GEM was inoculated with a 40 mL aliquot of the overnight culture and was incubated anaerobically at 37 °C for 22 h (with shaking at 50 rpm) to reach the early stationary growth phase. The culture was centrifuged ($4,000 \times g$, 10 min, 4 °C), after which the supernatant was discarded and the harvested cells were re-suspended (final viable counts in the range of 8-9 log cfu/mL) in 10 mL of PBS containing sucrose (5 g/L) and then stored at -80 °C. The frozen suspensions were freeze-dried (temperature -55 ± 2 °C; vacuum pressure <138 μHg ; freeze-drying speed 1 mm/h) for 40 h using a bench-top lyophiliser (model L-101, Liotop, São Carlos, Brazil).

Portions (4 g) of the obtained dried powders were packed in metalized BOPP bags, hermetically sealed and stored under freezing conditions (-18 ± 2 °C). At different storage time intervals (days 1, 7, 15, 30, 60, 90 and 120) viable cells were enumerated (Saarela et al., 2006a). For this, the dried powder was homogenized using PBS buffer (pH 7.2) at room

temperature for 10 min for rehydration (Saarela et al., 2009). The suspensions had OD_{625nm} values of approximately 2.0 (Ampatzoglou et al., 2010), and 1 mL aliquots were serially diluted in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL), then were plated on MRS agar (HiMedia, Mumbai, India). After incubating for 48 h at 37 °C under anaerobic conditions, the colonies were counted and the results were expressed as survival rate (N/N₀), where N is the viable count (log cfu/mL) of the freeze-dried cells at each of the monitored storage time intervals, and N₀ is the viable count in cell suspension before frozen storage. The detection limit of tests used to enumerate *Lactobacillus* cells was 1 log cfu/mL.

2.3 Survival of freeze-dried *Lactobacillus* cells in fruit juices during refrigerated storage

Three different commercial fruit juices (100% fruit juice without fruit pulp, additives or preservatives) were purchased from the local supermarkets (João Pessoa, Brazil), including apple juice (Natural One™, Jarinú, Brazil; pH 3.3), orange juice (Do Bem™, Rio de Janeiro, Brazil; pH 3.6) and grape juice (Quinta do Morgado™, Flores da Cunha, Brazil, pH 3.1). Enumeration assays of lactic acid bacteria, mesophilic bacteria and fungi in the tested fruit juices (APHA, 2015) showed counts of <1 log cfu/mL for lactic acid bacteria and <2 log cfu/mL for mesophilic bacteria and fungi. For survival assays of freeze-dried *Lactobacillus* strains, 200 mL aliquots of fresh fruit juice samples (room temperature) in sterilized glass flasks were inoculated aseptically with 2 g of the freshly freeze-dried *Lactobacillus* strain (room temperature; final counts varying between 8-9 log cfu/mL) and stored at 4 ± 0.5 °C for 21 days. On days 1, 7, 14 and 21, the viable cells were counted (as previously described in section 2.2) and the results were expressed as survival rate (N/N₀), where N is the viable count (log cfu/mL) in fruit juices containing the freeze-dried cells at each monitored storage time interval, and N₀ is the viable count in the same fruit juices immediately after the

incorporation of the freeze-dried cells. Fruit juice samples without added freeze-dried *Lactobacillus* cells were used as controls. The detection limit of the tests for enumerating *Lactobacillus* cells was 1 log cfu/mL.

2.4 Physicochemical parameters of fruit juices containing freeze-dried Lactobacillus cells

The pH, titratable acidity (TA), total soluble solids (TSS), viscosity and colour of the apple, orange and grape juices with or without added freeze-dried *Lactobacillus* cells were measured on days 1, 7, 14 and 21 of the refrigerated storage assay. The pH values were determined using a potentiometer with a combined glass electrode for pH determination (Model Q400AS, Diadema, São Paulo, Brazil) (AOAC, 2016). The TA (expressed as percent of malic acid for apple juice, citric acid for orange juice and tartaric acid for grape juice) was measured by titrating the samples with 0.1 N NaOH (AOAC, 2016). The TSS (°Brix) was measured using a digital refractometer (Model HI 96801, São Paulo, Brazil) at 25 ± 1 °C (AOAC, 2016). The apparent viscosity was measured using a viscometer (model VT550, Thermo Haake, Karlsruhe, Germany). The experimental measurements were obtained after the establishment of the sample equilibrium temperature (10 ± 1 °C) using a thermostatic bath coupled to the viscometer. For the determination of apparent viscosity, the equipment was operated in the manual mode. The measurements were carried out at a constant rate of 106 s^{-1} . The apparent viscosity was defined as the viscosity value presented after 30 s of deformation, and the values were expressed in mPa·s. A CR-300 colourimeter (Minolta Co., Osaka, Japan) was used for the instrumental colour evaluation. The CIE Lab colour scale ($L^*a^*b^*$) was standardized using the illuminant D65, and measurements were made through an 8-mm port/viewing area. The L^* (colour ranging from black to white), a^* (colour ranging from red to green) and b^* (colour ranging from yellow to blue) parameters were determined following

the International Commission on Illumination procedures (CIE, 1986). Numerical values of L^* , a^* and b^* were also converted into ΔE^* (total colour difference) using the following equation 1 (Di Cagno et al., 2011).

$$\Delta E = \{(\Delta L^2) + (\Delta a^2) + (\Delta b^2)\}^{1/2} \quad \text{Equation 1.}$$

2.5 Sugars and organic acid contents in fruit juices containing freeze-dried *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108

Water-soluble extracts from the apple, orange and grape juices with or without freeze-dried cells of *L. plantarum* 49 or *L. paracasei* 108 were obtained on days 1 and 14 of the refrigerated storage to quantify sugars (glucose and fructose) and organic acids (citric, lactic, malic, acetic, succinic and tartaric acids). These strains were selected because they presented the highest survival rates in fruit juices. First, 2 mL fruit juice aliquots were homogenized in 10 mL of ultra-pure water for 10 min using a mini-Turrax apparatus, and samples were then centrifuged (4,000 x *g*, 15 min, 4°C) and filtered through a 0.45 µm Millex-HA filter (Millipore Co., Bedford, MA) (Barreto et al., 2016). Sugars and organic acids were simultaneously quantified from the filtrates by high-performance liquid chromatography (HPLC) using an Agilent chromatograph (model 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, USA) equipped with a quaternary solvent pump (G1311C model), degasser, thermostatic column compartment (G1316A model), automatic auto-sampler (G1329B model) coupled with a diode arrangement detector (DAD) (G1315D model) and a refractive index detector (RID) (G1362A model). The analytic conditions were as follows: an Agilent Hi-Plex H column (7.7 × 300 mm, 8 µm); mobile phase 4 mM/L H₂SO₄ in ultrapure water; and a flow rate of 0.7 mL/min. The data were processed using the OpenLAB CDS ChemStation

Edition™ software (Agilent Technologies). The HPLC sample peaks were identified by comparing their retention times with those of sugar and organic acid standards. Duplicate injections were performed, and the average peak areas were used for quantification (Duarte et al., 2017). Tartaric, malic, lactic, citric, succinic and acetic acids were detected by the DAD at 210 nm; glucose and fructose were detected by the RID. The standards for glucose and fructose were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), and for citric, acetic, lactic, tartaric and malic acids were obtained from Vetec Química Fina (Rio de Janeiro, Brazil), all with a purity of $\geq 99\%$. Ultrapure water was obtained from a MilliQ® system (EMD Millipore, USA), and sulfuric acid was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

2.6 Survival of freeze-dried Lactobacillus cells in fruit juices during in vitro digestion

Apple, orange and grape juices and MRS broth samples containing the freeze-dried *Lactobacillus* cells (initial viable counts of 8-9 log cfu/mL; inoculation procedures were the same as those described in section 2.3) were exposed to the simulated gastrointestinal conditions as previously described (Albuquerque et al., 2017). First, 25 mL of fresh fruit juice or MRS broth was aliquoted into 50-mL glass flasks, in which the subsequent steps of the test were performed continuously. The simulation was performed in stages to mimic mastication, and conditions in the oesophagus-stomach, duodenum and ileum. The mechanical agitation was used to simulate peristaltic movements and the test was performed in an incubator at 37 °C with rotational adjustment in each phase. The mastication was simulated using 100 U α -amylase diluted in 1 mL of 1 mM CaCl_2 with the pH adjusted to 6.9 with 1 M NaHCO_3 and an exposure time of 2 min at 200 rpm was used. The oesophagus-stomach conditions had 25 mg of pepsin diluted in 1 mL of 0.1 M HCl, added at a rate of 0.05 mL/mL, with a gradual decrease in pH using 1 M HCl (pH 5.5 for 10 min; pH 4.6 for 10 min; pH 3.8 for 10 min; pH

2.8 for 20 min; pH 2.3 for 20 min and pH 2.0 for 20 min) with stirring (130 rpm). Duodenal conditions were simulated with 2 g pancreatin/L of 0.1 M NaHCO₃ and 12 g bovine bile salts/L of 0.1 M NaHCO₃, with the pH adjusted to 5.0 with 0.1 M NaHCO₃ and an exposure time of 30 min with stirring (45 rpm). Ileal conditions were simulated with the pH adjusted to 6.5 using 0.1 M NaHCO₃ and an exposure time of 60 min with stirring (45 rpm). All enzymes and bovine bile salts were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Inoculated fruit juice and MRS broth samples maintained at 37 °C without exposure to the *in vitro* digestion were used as controls. After each simulated gastrointestinal condition, 100 µL aliquots of the juices and MRS broth were serially diluted in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) and plated on MRS agar (HiMedia, Mumbai, India). After an incubation period of 48 h at 37 °C under anaerobic conditions (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid), the viable cells were counted. The results were expressed as survival rate (N/N₀), where N is the viable count (log cfu/mL) in fruit juices or MRS broth containing the freeze-dried cells on each monitored step of the *in vitro* digestion, and N₀ is the viable count in the same fruit juices or MRS broth immediately after the incorporation of the freeze-dried cells.

2.7 Statistical analyses

All analyses were performed in triplicate in two different experiments, and the results are expressed as the averages ± standard deviations. The data of bacterial survival during frozen storage, in the fruit juices during refrigerated storage or when exposed to *in vitro* digestion, as well as the data of the monitored physicochemical parameters of juices were submitted to analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test. A Student's t test was used to determine differences between the contents of each of the monitored organic acids or sugars in juices on day 1 and 14 of storage. All analysis

considered $p \leq 0.05$ for statistically significant differences. These analyses were performed using the computational software GraphPad Prism 6.0.

3. Results

3.1 Survival of freeze-dried *Lactobacillus* cells during frozen storage

The survival rates of freeze-dried cells of *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 and *L. pentosus* 129 during 120 days of frozen storage were in the range of 1.00 ± 0.08 to 0.23 ± 0.05 (data not shown). No decrease in the survival rates of the freeze-dried *Lactobacillus* strains were observed on days 1, 7, 15 and 30 of storage. On day 60 of storage, the observed survival rate was 0.67 ± 0.04 for *L. brevis* 59 and approximately 0.90 ± 0.05 for the other four tested *Lactobacillus* strains. No differences ($p > 0.05$) in the survival rates of *L. plantarum* 49, *L. paracasei* 108, *L. brevis* 59 and *L. fermentum* 111 were observed between days 60 and 90 of storage, whereas the survival rate of *L. pentosus* 129 decreased from 0.85 ± 0.03 to 0.51 ± 0.04 during this storage time interval. After 120 days of storage, the highest survival rates (0.75 ; $p \leq 0.05$) were observed for *L. paracasei* 108 and *L. plantarum* 49 (viable counts of approximately 6 log cfu/mL), whereas both *L. fermentum* 111 and *L. brevis* 59 had a survival rate of approximately 0.47 ± 0.02 (viable counts of 4 log cfu/mL). The survival rate of *L. pentosus* 129 was 0.21 ± 0.03 (viable counts of <2 log cfu/mL).

3.2 Survival of freeze-dried *Lactobacillus* cells in fruit juices

The survival rates of *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 and *L. pentosus* 129 added as freeze-dried cells into apple, orange and grape juices and stored for 21 days under refrigerated conditions are shown in Table 1. The survival rates of

the *Lactobacillus* strains in fruit juices on the day 1 were approximately 1.00 ± 0.05 . The survival rates of all *Lactobacillus* cells decreased in all fruit juices over the monitored storage time period. The highest and the lowest survival rates ($p \leq 0.05$) in juices over the 21 days were observed for *L. paracasei* 108 (0.68 ± 0.01) and *L. fermentum* 111 (0.49 ± 0.03), respectively.

In apple juice, the survival rates of all freeze-dried *Lactobacillus* strains were >0.75 up to day 14 of storage. In orange juice, the survival rates of *L. plantarum* 49 and *L. brevis* 59 were >0.75 up to day 7. However, on day 14 only *L. paracasei* 108 and *L. plantarum* 49 showed survival rates of >0.75 . In grape juice, the survival rates of *L. plantarum* 49, *L. fermentum* 111 and *L. pentosus* 129 were >0.70 up to day 7 of storage. Similar to what was observed in orange juice, only *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 showed survival rates of >0.75 up to day 14 of storage.

3.3 Physicochemical parameters of fruit juices containing freeze-dried cells of *Lactobacillus*

The TA, pH, TSS and viscosity of the apple, orange and grape juices with or without added freeze-dried cells of *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 or *L. pentosus* 129 did not vary ($p > 0.05$) up to day 14 of refrigerated storage (supplementary material, S1). Apple juice, with or without added freeze-dried *Lactobacillus* cells (any of the five assayed strains), showed an increase ($p \leq 0.05$) in pH values on day 21 of storage. In orange juice, the pH changes on day 21 varied depending on the added *Lactobacillus* strain; no changes in pH were observed in the orange juice without freeze-dried cells on day 21. Grape juice with or without added *L. plantarum* 49 freeze-dried cells showed lower pH values ($p \leq 0.05$) on day 21 of storage, while grape juice containing *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 or *L. pentosus* 129 showed higher pH values ($p \leq 0.05$) compared to day 1.

Increases ($p \leq 0.05$) in TA on day 21 were only observed in apple juice containing *L. fermentum* 111 or *L. pentosus* 129. In orange and grape juice, the TA on day 21 only increased in samples containing *L. plantarum* 49 or *L. brevis* 59. The TA did not vary ($p > 0.05$) in orange and grape juice containing *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 or *L. pentosus* 129 over the monitored storage time.

The TSS values increased ($p \leq 0.05$) on day 21 of storage in apple juice containing *L. brevis* 59, *L. fermentum* 111 or *L. pentosus* 129; otherwise, the TSS values decreased ($p \leq 0.05$) in orange juice regardless of the added *Lactobacillus* strain as well as in control samples on this same storage period. No changes in TSS values were observed on day 21 in grape juice containing added freeze-dried *Lactobacillus* cells or in the control samples.

The viscosity values increased ($p \leq 0.05$) on day 21 of storage in apple juice containing *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59 or *L. fermentum* 111, as well as in the control samples. Decreases ($p \leq 0.05$) in viscosity on day 21 were observed in apple juice containing *L. paracasei* 108 or *L. pentosus* 129. In orange and grape juices, the viscosity increased on day 21 in juice samples containing freeze-dried *Lactobacillus* cells regardless of the added *Lactobacillus* strain as well as in control samples.

Changes in L^* , a^* or b^* values over time in fruit juice were observed regardless the addition of *Lactobacillus* cells. The L^* value decreased ($p \leq 0.05$) in apple and grape juices and increased ($p \leq 0.05$) in orange juice during the 21 days of storage. The a^* value increased in apple and grape juices but did not change in orange juice over the monitored storage time. The b^* value did not change in apple juice, decreased in grape juice and increased in orange juice over time (data not shown). The ΔE value varied in juices that did or did not contain freeze-dried *Lactobacillus* cells. All juices presented ΔE values of >2 on day 21 of storage, with the exception of apple juice containing *L. paracasei* 108 or *L. fermentum* 111.

3.4 Sugar and organic acid contents in fruit juices with freeze-dried *L. paracasei* 108 or *L. plantarum* 49 cells

The highest contents ($p \leq 0.05$) of malic, citric and tartaric acids were detected in apple, orange and grape juices without added *Lactobacillus* cells, respectively, which did not vary ($p > 0.05$) over the monitored storage period. The contents of malic and lactic acid decreased and increased ($p \leq 0.05$) over time in juice samples with either *L. paracasei* 108 or *L. plantarum* 49, respectively (Fig. 1).

Succinic acid was only detected in orange juice containing *L. paracasei* 108 or *L. plantarum* 49. The tartaric acid content decreased ($p \leq 0.05$) in grape juice containing *L. paracasei* 108 or *L. plantarum* 49 over the monitored storage period. The tartaric acid content did not vary ($p > 0.05$) over time in apple juice containing added *Lactobacillus* cells. The contents of citric acid decreased ($p \leq 0.05$) over time in apple and grape juice containing *L. paracasei* 108 or *L. plantarum* 49. The content of citric acid did not vary ($p > 0.05$) in orange juice containing *Lactobacillus* cells.

Glucose contents decreased during the 14 days of storage in all assayed juices containing *L. paracasei* 108 or *L. plantarum* 49, whereas no changes were observed in juices without added *Lactobacillus* (Fig. 2).

3.5 Viability of freeze-dried *Lactobacillus* cells in fruit juices during *in vitro* digestion

The exposure to experimental mouth conditions (1st digestive step, pH 6.9, exposure time 2 min) did not decrease ($p > 0.05$) the viable counts (survival rates 1.00) of the added freeze-dried *Lactobacillus* strains in the tested fruit juices or in MRS broth. No decreases ($p > 0.05$) in survival rates of added freeze-dried cells of *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59 and *L.*

fermentum 111 in all the tested fruit juices, as well as of *L. paracasei* 108 in grape and apple juices, were observed until exposure to the 5th digestive step (pepsin, pH 2.8, exposure time 52 min). The survival rate of *L. pentosus* 129 in grape juice after exposure to the 5th digestive step was approximately 0.75 ± 0.07 , a decrease of 1.79 log units, and in apple juice was <0.2 (viable counts <2 log cfu/mL). The exposure to the 6th digestive step (stomach conditions, pH 2.3, exposure time 72 min) did not change the survival rates of *L. plantarum* 49 or *L. paracasei* 108 in apple juice, *L. fermentum* 111 or *L. brevis* 59 in grape or apple juice, or *L. pentosus* 129 in orange juice (Fig. 3).

The exposure to the 7th digestive step (stomach condition, pH 2.0, exposure time 92 min) caused sharp decreases in survival rates of *L. plantarum* 49 in grape juice, of *L. brevis* 59 and *L. pentosus* 129 in orange juice, and of *L. paracasei* 108 and *L. fermentum* 111 in grape and orange juice. The survival rates were of <0.2 for *L. fermentum* 111 in grape and orange juice. Survival rates <0.2 were also observed for *L. pentosus* 129 in MRS when exposed to the 7th digestive step.

The exposure to duodenal (8th digestive step: pancreatin + bile salts, pH 5.0, exposure time 122 min) and ileal conditions (9th digestive step: pH 5.0, exposure time 182 min) did not result in further changes in survival rate for *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 in grape juice or *L. brevis* 59 in orange juice (survival rates approximately 0.45 ± 0.05). At the end of the exposure to the gastrointestinal conditions (after simulated ileal conditions; 9th digestive step, pH 6.5, exposure time 182 min), the survival rates of *L. plantarum* 49, *L. paracasei* 108 and *L. fermentum* 111 in apple juice and the survival rates of *L. brevis* 59 in grape and apple juice were consistently >0.78 . At the end of the simulated gastrointestinal conditions, survival rates of >0.80 were observed for *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108 and *L. fermentum* 111 in apple

juice and for *L. plantarum* 49 in apple and orange juices. The highest survival rate observed for *L. pentosus* 129 at the end of the *in vitro* digestion was 0.67 ± 0.01 in grape juice.

The survival rates of the added *Lactobacillus* cells in fruit juices at the end of the simulated digestion were always similar or higher than those observed when the strains were assayed in MRS broth, with the exceptions of *L. paracasei* 108 and *L. plantarum* 49 in grape juice. Overall, *L. fermentum* 111 and *L. pentosus* 129 were the most sensitive strains to the exposure to the simulated gastrointestinal conditions, and the apple and grape juices better protected the tested strains under these conditions. The survival rates of the *Lactobacillus* strains in fruit juices and MRS broth not exposed to the simulated gastrointestinal conditions were near to 1.00 during the 182 min exposure period.

4. Discussion

The survival rates of freeze-dried cells of *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 and *L. pentosus* 129 were stable up to 30 days of frozen storage, which is in agreement with previous studies on freeze-dried *Lactobacillus* cells using sucrose as cryoprotectant (Saarela et al., 2006b; Schoug et al., 2006). After longer storage time, the decreases in cell survival rates were notable among the five *Lactobacillus* species studied. The decreases in bacterial survival imposed by freeze-drying are associated with exposure of cells to very low freezing temperatures and dehydration (Romano et al., 2016).

The tolerance to stress conditions varies among *Lactobacillus* species or strains (Ampatzoglou et al., 2010). This could explain the highest survival rates observed for *L. paracasei* 108 and *L. plantarum* 49 over the frozen storage in relation to the other strains tested in this study. The tolerance to freeze-drying in *Lactobacillus* can be improved with the use of different cryoprotectants (De Giulio et al., 2005; Romano et al., 2016; Saarela et al.,

2006b), which should be exploited in future investigations using the same strains tested in this study.

The survival rates of freeze-dried cells of *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 or *L. pentosus* 129 decreased in apple, grape and orange juices over the refrigerated storage period of 21 days. All assayed *Lactobacillus* strains showed survival rates of >0.75 up to day 14 of storage in apple juice, whereas only *L. paracasei* 108 and *L. plantarum* 49 had survival rates of >0.75 in grape and orange juice up to the day 14 of the storage. An adaptation step before inoculation in acidic juices has been proposed as possible strategy to enhance the survival of *Lactobacillus* cells over time (Saarela et al., 2006b). Still, a previous study reported that some *Lactobacillus* species (e.g., *L. casei* and *L. rhamnosus*) could adapt faster to apple juice than to orange and grape juices (Espírito-Santo et al., 2015). A short pre-inoculation adaptation step after rehydration would likely have improved the survival of the test strains when they were incorporated in the assayed fruit juices (De Angelis et al., 2001; İlhak et al., 2011; Settachaimongkon et al., 2015).

Overall, *L. paracasei* 108 and *L. plantarum* 49 were the only strains that showed a survival rate of >0.75 in apple, grape and orange juices on day 14 of refrigerated storage, with viable counts of >6 log cfu/mL. Specific count levels have been suggested as the minimum number of viable cells per gram for a given portion of probiotic foods (Ding and Shah, 2008; Kailasapathy and Chin, 2000). However, for specific health claims, probiotics in food must prove the delivery of an effective dose at the end of the shelf-life, which could vary among strains (Hill et al., 2014). Further studies focusing on the health benefits of *L. paracasei* 108 and *L. plantarum* 49 using *in vivo* models and clinical trials should indicate the effective dose related to a specific health claim, and, consequently, the dose needed for formulation of probiotic fruit juices and at the end of the shelf-life.

The addition of all the tested *Lactobacillus* strains did not change the TA, pH or TSS values of fruit juices up to day 14 of storage. This physicochemical stability is noteworthy and indicates that the juices containing the freeze-dried *Lactobacillus* cells remain similar to those that were newly manufactured, even after two weeks of refrigerated storage (Pimentel et al., 2015; Costa et al., 2017). The changes in TA, pH and TSS observed on day 21 of storage depended on the added lactobacilli strain and the juice type. These results are likely related to the ability of the *Lactobacillus* strains to use the sugars in the juice as substrates for their metabolism, with consequent production of organic acids (Sohail et al., 2012). An increase in TSS has also been tentatively associated with the hydrolysis of the sugars in the fruit juices by enzymes released from dead lactobacilli cells (Ding and Shah, 2008).

The viscosity values increased during the storage of apple, orange and grape juices containing at least two out of the five assayed freeze-dried *Lactobacillus* strains and in juices without added *Lactobacillus* cells. The increased viscosity detected in the fruit juices could be related to the ability of some lactobacilli species to produce exopolysaccharides that may act as texturizing agents, increasing the viscosity of the final product and interacting with the other juice constituents (e.g., proteins) (Costa et al., 2017). Considering that juice samples without added freeze-dried *Lactobacillus* cells also showed increased viscosity, the interaction between compounds present in fruit juices (e.g., sugars, pectin and protein) to increase or strengthen the hydrogen bonds among solutes that result in decreased intermolecular spacing should be considered (Manjunatha and Raju, 2013). The ΔE values of >2 revealed visually perceptible colour alterations (Lee and Coates, 2003) in orange and grape juices with or without added lactobacilli over time. Changes in the colour of fruit juices are primarily related to enzymatic darkening reactions by oxidation of fruit polyphenolic compounds (Pimentel et

al., 2015), as well as of pigments, such as anthocyanin and carotenoids, that are abundant in grape and orange juice, respectively (Ścibisz et al., 2012; Zepka et al., 2014).

Since *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 were the best survivors in the juice stability studies, only their influence on the contents of organic acids and sugars in fruit juices was evaluated. Citric, malic or tartaric acid are the organic acids that occur naturally in apple, grape and orange pulp (Costa et al., 2017; Espírito-Santo et al., 2015; Pimentel et al., 2015). *Lactobacilli* can convert malic acid into lactic acid and carbon dioxide (Espírito-Santo et al., 2015). The conversion of malic acid into lactic acid may be associated with the decrease in observed malic acid content, whereas the lactic acid contents increased in all fruit juices with added lactobacilli cells. Malolactic fermentation is one of the primary mechanisms cells use for protection from acidic stress in juices (Bravo-Ferrada et al., 2015) and could be associated with the higher survival rates observed for these strains in the tested fruit juices.

The observed decreases in glucose or fructose contents, as well as the increases in lactic acid contents, over time in juices containing *L. paracasei* 108 or *L. plantarum* 49 could be associated with the metabolic activity of the added cells in the juices, since no changes were observed in juices without added *Lactobacillus* cells. The observed decreases of tartaric acid contents in grape juices containing *L. paracasei* 108 or *L. plantarum* 49 could be related to acid degradation by these strains (Elferink et al., 2001; Krumperman and Vaughn, 1966).

The ability to tolerate digestive stresses *in vitro* varied among the tested *Lactobacillus* strains. In apple juice, at the end of the *in vitro* digestion *L. plantarum* 49, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 and *L. brevis* 59 exhibited survival rates of >0.80. Similar survival rates were observed for *L. brevis* 59 in grape juice and for *L. plantarum* 49 in orange juice. The combined effects of the juice composition and strain specific properties on bacterial survival rates can be seen in the behaviour of the strains when exposed to the acidic conditions

imposed at the 5th, 6th and 7th *in vitro* digestion steps (pH 2.8-2.0), where all strains showed a sharp decrease in survival rates when assayed in at least one of the tested fruit juices. Overall, the survival rates of the studied *Lactobacillus* strains when incorporated into fruit juices was higher than in MRS broth, indicating that different protective effects were exerted by the tested juices. Interestingly, *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 showed the lowest decreases in survival rates throughout the exposure to the gastrointestinal conditions, as has been observed in assays for survival during frozen storage and in juices during refrigerated storage.

In conclusion, the results of this study demonstrated that freeze-dried cells of the fruit-derived strains *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 and *L. pentosus* 129 were capable of surviving during frozen storage. All freeze-dried strains maintained high survival rates after up to 14 days of refrigerated storage in apple juice, and *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 also had high survival rates in orange and grape juices. The incorporation of the freeze-dried *Lactobacillus* cells did not cause alterations in TA, pH and TSS in fruit juices during the 14 days of refrigerated storage. The changes over time in organic acids and sugar contents varied depending on the fruit juice and added strain. Tolerance to digestive stresses varied among the tested *Lactobacillus* strains, with *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 showing the highest survival rates at the end of the *in vitro* digestion. These data indicate that apple juice is a suitable vehicle to deliver the tested fruit-derived freeze-dried *Lactobacillus* strains, and *L. paracasei* 108 and *L. plantarum* 49 had the best ability to survive in the tested fruit juices over time. Further studies should be performed with the tested *Lactobacillus* strains to evaluate the impact of industrially relevant strategies and procedures on their survival following freeze-drying and incorporation into fruit juices.

Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq (Brazil) and CAPES for financial support (Science without Borders Program, Special Visiting Researcher; Grant 400384/2013-2).

References

- Albuquerque, T.M.R., Garcia, E.F., Araújo, A.O., Magnani, M., Saarela, M., Souza, E.L., 2017. *In vitro* characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics Antimicrob. Prot.* 1-13.
- Alves, N.N., Messaoud, G.B., Desobry, S., Costa, J.M.C., Rodrigues, S., 2016. Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. *J Food Eng.* 189, 45-54.
- American Public Health Association (APHA), 2015. Compendium for the microbiological examination of foods. American Public Health, Washington D.C.
- Ampatzoglou, A., Schurr, B., Deepika, G., Baipong, S., Charalampopoulos, D., 2010. Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Biochem. Eng. J.* 52, 65-70.
- Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis of A.O.A.C. International., 2016. 20th ed.
- Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E., Paganou, 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.
- Barreto, T.A., Andrade, S.C.A., Maciel, J.F., Oliveira, N.M., Madruga, M.S., Meireles, B., Cordeiro, A., Souza, E.L., Magnani, M., 2016. A chitosan coating containing essential oil

from *Origanum vulgare* L. to control postharvest mold infections and keep the quality of cherry tomato fruit. *Front Microbiol.* 7, 17-24.

Bravo-Ferrada, B.M., Brizuela, N., Gerbino, E., Gomez-Zavaglia, A., Semorile, L., Tymczyszyn, E.E., 2015. Effect of protective agents and previous acclimation on ethanol resistance of frozen and freeze-dried *Lactobacillus plantarum* strains. *Cryobiology* 71, 522-528.

Champagne, C.P., Gardner, N.J., 2008. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Res. Int.* 41, 539-543.

Champagne, C.P., Ross, R.P., Saarela, M., Hansen, K.F., Charalampopoulos, D., 2011. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 185-193.

CIE - Commission Internationale de l'Éclairage, 1986. *Colourimetry*, second ed. CIE Publication, Vienna.

Costa, G.M., Silva, J.V.C., Mingotti, J.D., Barão, C.E., Klososki, S.J., Pimentel, T.C., 2017. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. *LWT Food Sci. Technol.* 75, 195-201.

De Angelis, M., Bini, L., Pallini, V., Cocconcelli, P.S., Gobbetti, M., 2001. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* 147, 1863-1873.

De Giulio, B., Orlando, P., Barba, G., Coppola, R., De Rosa, M., Sada, A., De Prisco, P.P., Nazzaro, F., 2005. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 739–746.

Di Cagno, R., Filannino, P., Vincentina, O., Lanera, A., Cavoski, I., Gobbetti, M., 2016.

Exploitation of *Leuconostoc mesenteroides* strains to improve shelf life, rheological, sensory

and functional features of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) fruit puree. Food Microbiol. 59, 176-189.

Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C.G., Ricciuti, P., and 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.

Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., Angelis, M., Gobbetti, M., 2011. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. Food Microbiol. 28, 1062-1071.

Di Cagno, R., Surico, R.F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J.C., Buchin, S., De Gara, L., Gobbetti, M., 2008. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. Int. J. Food Microbiol. 128, 473-483.

Ding, W.K., Shah, N.P., 2008. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. Int. Food Res. J. 15, 219-232.

Duarte, F.N.D., Rodrigues, J.B., Lima, M.C., Lima, M.S., Pacheco, M.T.B., Pintado, M.M.E., Aquino, J.S., Souza, E.L., 2017. Potential prebiotic properties of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) agro-industrial byproduct on *Lactobacillus* species. J. Sci. Food Agric., 97, 3712-3719.

Elferink, S.J.W.H.O., Krooneman, J., Gottschal, J.C., Spoelstra, S.F., Faber, F., Driehuis, F., 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 125-132.

Espírito-Santo, A.P., Carlin, F., Renard, C.M.G.C., 2015. Apple, grape or orange juice:

Which one offers the best substrate for lactobacilli growth? - A screening study on bacteria

viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. Food Res. Int. 78, 352–360.

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., Souza, E.L., 2016. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. Front. Microbiol. 7, 1-11.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 11, 506–514.

İlhak, O.İ., Oksuztepe, G., Calicioglu, M., Patir, B., 2011. Effect of acid adaptation and different salt concentrations on survival of *Listeria monocytogenes* in Turkish white cheese. J. Food Qual. 34, 379-385.

Kailasapathy, K., Chin, J., 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Immunol. Cell Biol. 78, 80-88.

Krumperman, P.H., Vaughn, R.H., 1966. Some lactobacilli associated with decomposition of tartaric acid in wine. Am. J. Enol. Vitic. 17, 185-190.

Lee, H.S., Coates, G.A., 2003. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. LWT Food Sci. Technol. 36, 153-156.

Manjunatha, S.S., Raju, P.S., 2013. Modelling the rheological behaviour of tender coconut (*Cocos nucifera* L.) water and its concentrates. Int. Food Res. J. 20, 731-743.

- Martín, M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A., Morales, M.A., 2015. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 15-25.
- Nuallkaekul, S., Charalampopoulos, D., 2011. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 111–117.
- Nuallkaekul, 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.
- Nuallkaekul, S., Salmeron, I., Charalampopoulos, D., 2011. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chem.* 129, 1037–1044.
- Pimentel, T.C., Madrona, G.S., Garcia, S., Prudencio, S.L., 2015. 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 Sci. Technol.* 63, 415-422.
- Romano, N., Schebor, C., Mobili, P., Gómez-Zavaglia, A., 2016. Role of mono- and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Res. Int.* 90, 251–258.
- Saarela, M., Alakomi, H.L., Puhakka, A., Mättö, J., 2009. Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1204-1212.
- Saarela, M., Virkajari, I., Alakomi, H.L., Sigvard-Mattila, P., Matto, J., 2006a. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *Int. Dairy J.* 16, 1477-1482.

- Saarela, M., Virkajärvi, I., Nohynek, L., Vaari, A., Mättö, J., 2006b. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *Int. J. Food Microbiol.* 112, 171–178.
- Schoug, Å., Olsson, J., Carlfors, J., Schnürer, J., Håkansson, S., 2006. Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3 - effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology* 53, 119–127.
- Ścibisz, I., Ziarno, M., Mitek, M., Zaręba, D., 2012. Effect of probiotic cultures on the stability of anthocyanins in blueberry yoghurts. *LWT Food Sci. Technol.* 49, 208–212.
- Settachaimongkon, S., Van Valenberg, H.J.F., Winata, V., Wang, X., Nout, M.J.R., Van Hooijdonk, T.C.M., Zwietering, M.H., Smid, E.J., 2015. Effect of sublethal preculturing on the survival of probiotics and metabolite formation in set-yoghurt. *Food Microbiol.* 49, 104–115.
- 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, 279–84.
- Sohail, A., Turnera, M.S., Prabawatib, E.K., Coombesc, A.G.A., Bhandaria, B., 2012. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 162–166.
- Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C.G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., Gobbetti, M., Cagno, R.D., 2012. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiol.* 31, 116–125.

Zepka, L.Q., Garruti, D.S., Sampaio, K.L., Mercadante, A.Z., Silva, M.A.A.P., 2014. Aroma compounds derived from the thermal degradation of carotenoids in a cashew apple juice model. *Food Res. Int.* 56, 108-114.

Fig. 1. Average contents ($n = 6$) of organic acids (citric, malic, lactic, succinic, acetic and tartaric acid; g/L) in apple (A, B, C, D), orange (E, F, G, H) and grape (I, J, L, M) juices with or without added freeze-dried cells of *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 on day 1 (■) and 14 (▨) of the refrigerated storage ($4 \pm 0.5^\circ\text{C}$). C: control juice without added freeze-dried cells; Lpl 49: juice with freeze-dried cells of *L. plantarum* 49; and Lpc 108, juice with freeze-dried cells of *L. paracasei* 108. The error bars represent the standard deviations. Different small letters for the same fruit juice with or without each of the added freeze-dried strains denotes a difference ($p \leq 0.05$) among the values, based on the Tukey's test; an asterisk denotes difference between the data obtained for the same fruit juice with or without the added freeze-dried strain on day 1 and 14 of storage ($p \leq 0.05$), based on Student's t test.

Fig. 2. Average contents ($n = 6$) of glucose and fructose sugars (g/L) in apple (A; B), orange (C; D) and grape (E; F) juices with or without freeze-dried cells of *L. plantarum* 49 and *L. paracasei* 108 on day 1 (■) and 14 (▨) of refrigerated storage ($4 \pm 0.5^\circ\text{C}$). C: Control juice,

without added freeze-dried cells; Lpl 49: juice with freeze-dried cells of *L. plantarum* 49; and Lpc 108: juice with freeze-dried cells of *L. paracasei* 108. The error bars represent the standard deviations. Different small letters for the same fruit juice with or without each of the added freeze-dried strains denotes a difference ($p \leq 0.05$) among the values, based on the Tukey's test; an asterisk denotes a difference between the data obtained for the same fruit juice with or without the added freeze-dried strain on days 1-14 of storage ($p \leq 0.05$), based on Student's t test.

Fig. 3. Survival rates (averages $\pm$ standard deviations; $n = 6$) of freeze-dried cells of *L. plantarum* 49 (A), *L. brevis* 59 (B), *L. paracasei* 108 (C), *L. fermentum* 111 (D) and *L. pentosus* 129 (E) in apple (■), orange (▲) and grape (●) juices and in MRS broth (✱) during *in vitro* digestion. The error bars represent the standard deviations. Survival rates: N/N_0 ; where N is the viable count (log cfu/mL) in fruit juices or MRS broth containing the freeze-dried cells at each monitored step of the *in vitro* digestion, and N_0 is the viable count in the same fruit juices or MRS broth immediately after the incorporation of the freeze-dried cells.

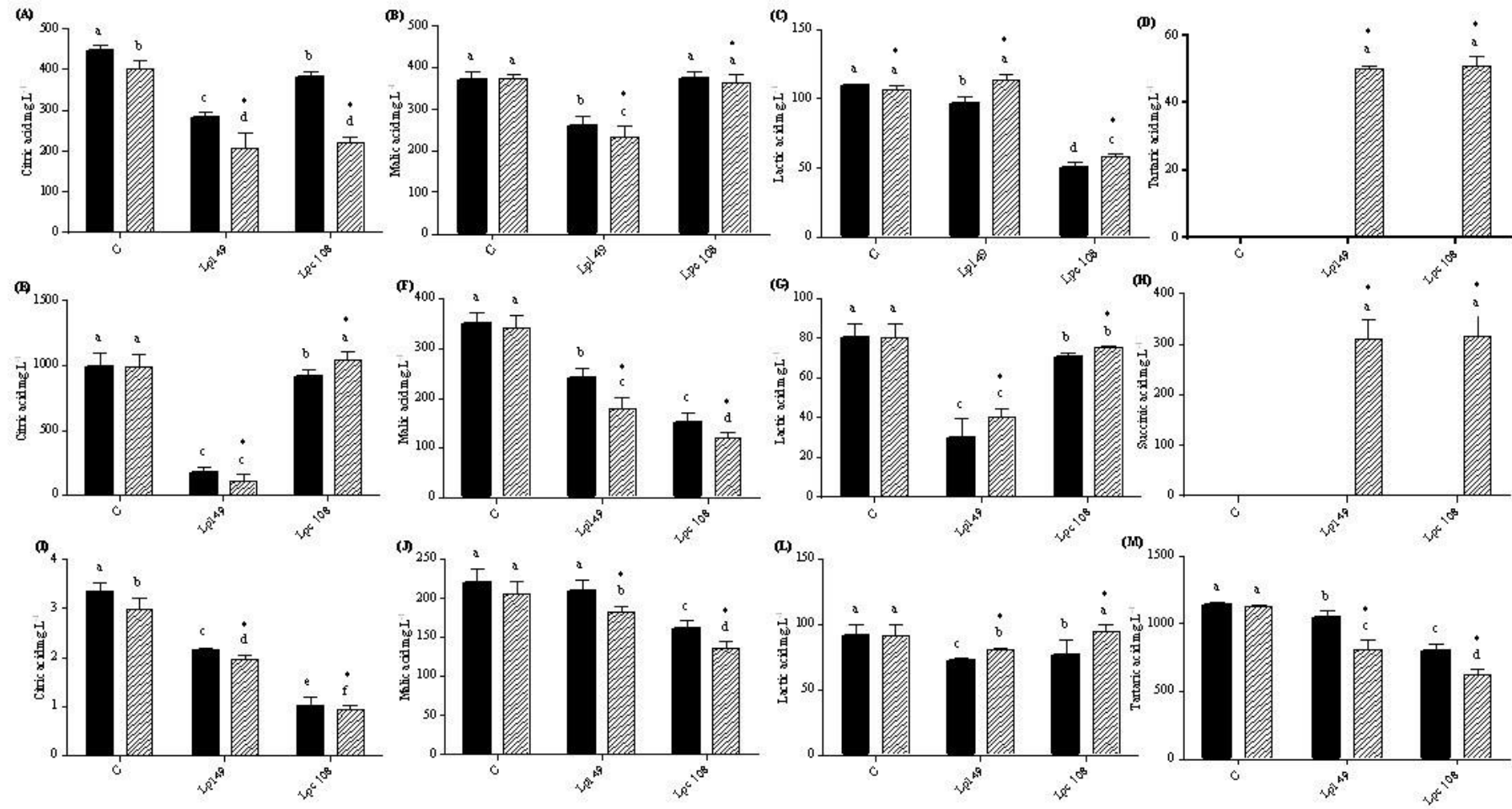


Fig. 1

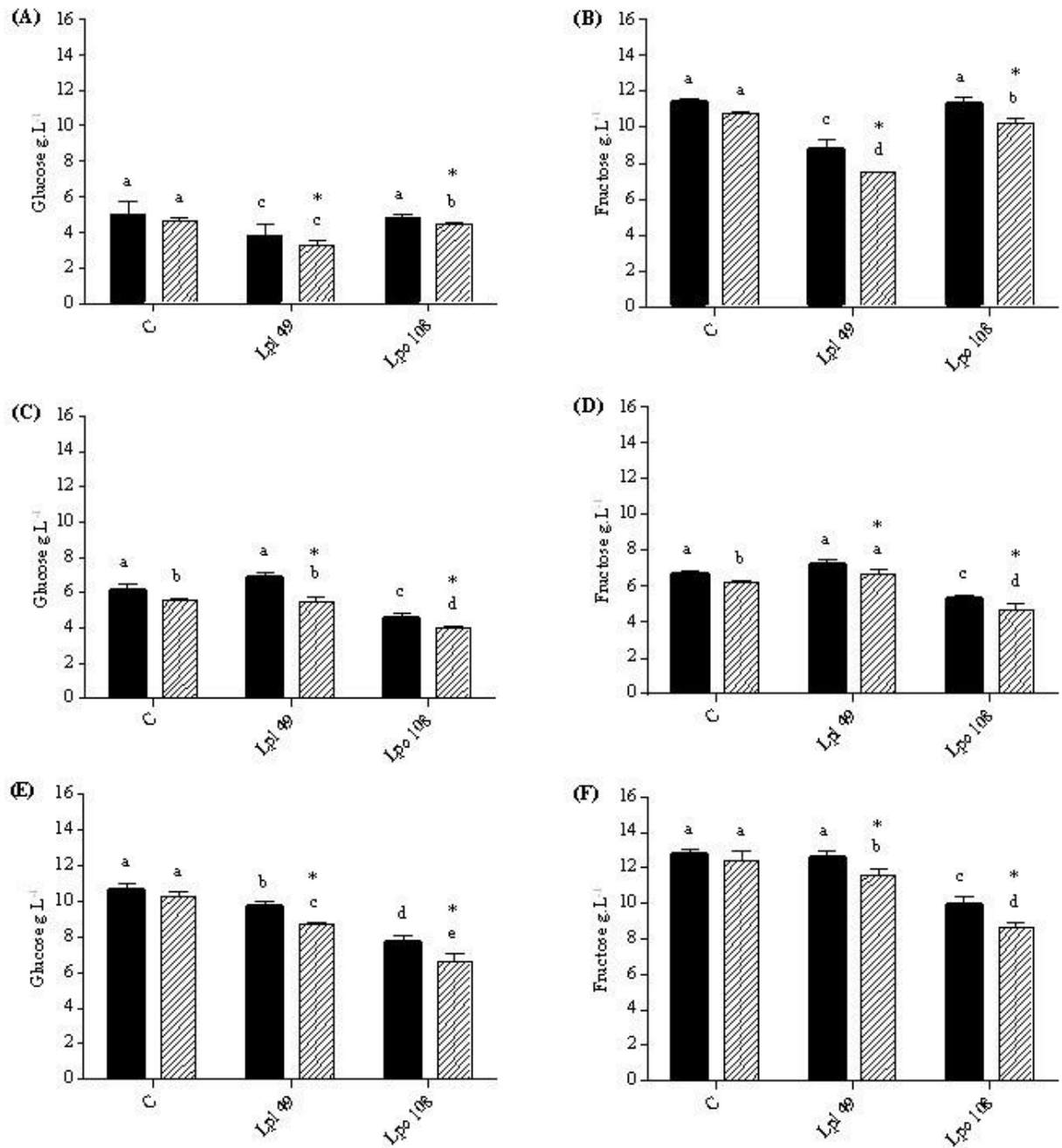


Fig. 2

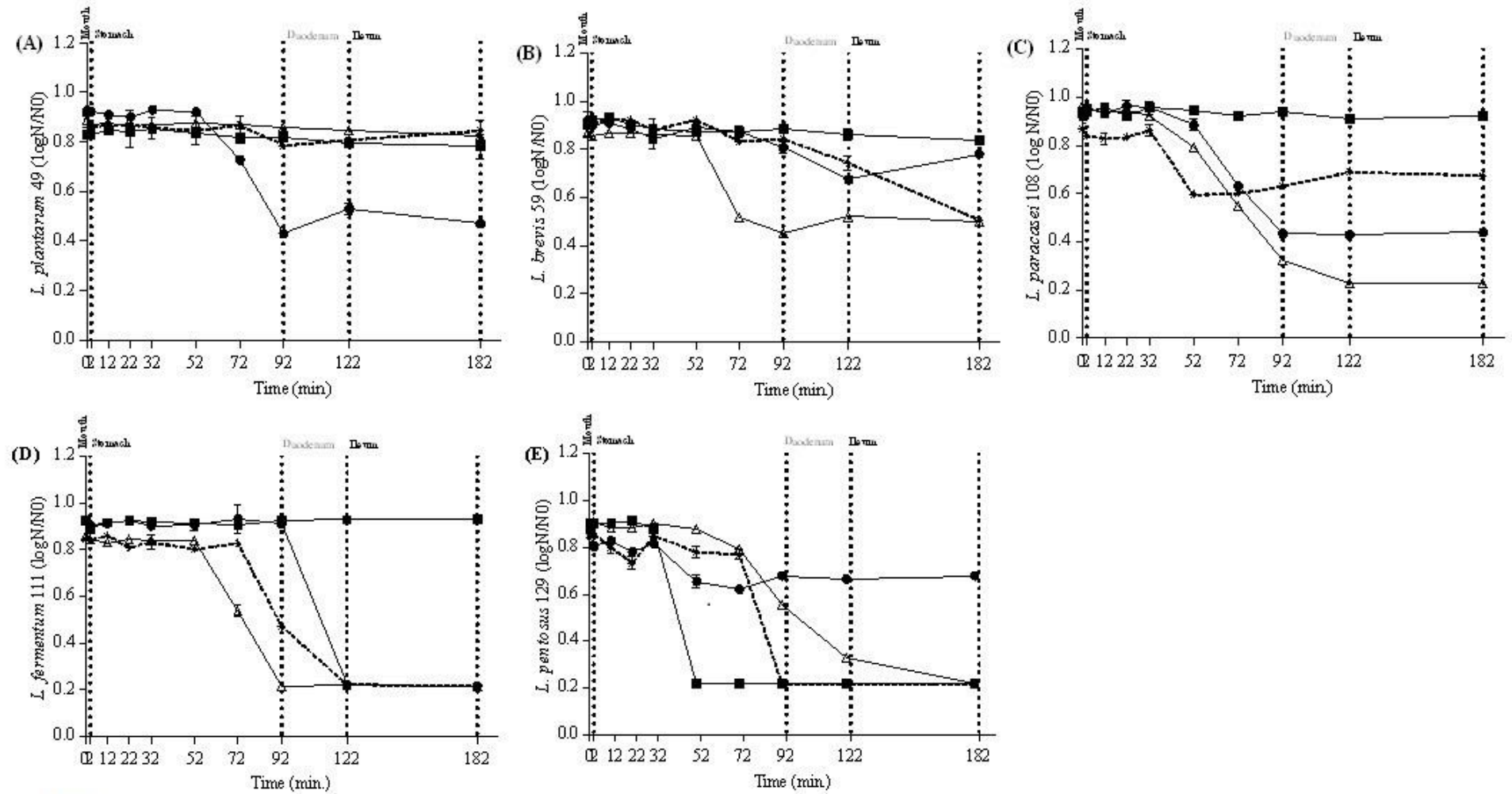


Fig. 3

Table 1. Survival rates (averages $\pm$ standard deviations; n = 6) of freeze-dried cells of *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 and *L. pentosus* 129 in apple, orange and grape juices during 21 days of refrigerated storage ($4 \pm 0.5^\circ\text{C}$).

Fruit juice	Days of storage	Added freeze-dried <i>Lactobacillus</i> strain				
		<i>L. plantarum</i> 49	<i>L. brevis</i> 59	<i>L. paracasei</i> 108	<i>L. fermentum</i> 111	<i>L. pentosus</i> 129
Apple juice	1	0.99 $\pm$ 0.01 ^{Ba}	0.95 $\pm$ 0.01 ^{Ca}	1.05 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	0.98 $\pm$ 0.01 ^{Ba}	1.05 $\pm$ 0.01 ^{Aa}
	7	0.89 $\pm$ 0.01 ^{ABb}	0.91 $\pm$ 0.03 ^{Aba}	0.95 $\pm$ 0.03 ^{Ab}	0.85 $\pm$ 0.02 ^{Bb}	0.93 $\pm$ 0.04 ^{Ab}
	14	0.75 $\pm$ 0.01 ^{Ac}	0.78 $\pm$ 0.04 ^{Ab}	0.83 $\pm$ 0.03 ^{Ac}	0.75 $\pm$ 0.02 ^{Ac}	0.84 $\pm$ 0.06 ^{Ab}
	21	0.65 $\pm$ 0.03 ^{ABd}	0.61 $\pm$ 0.02 ^{BCc}	0.68 $\pm$ 0.01 ^{Ad}	0.60 $\pm$ 0.01 ^{Cd}	0.61 $\pm$ 0.02 ^{BCc}
Orange juice	1	0.98 $\pm$ 0.01 ^{Ba}	1.05 $\pm$ 0.01 ^{Aba}	1.09 $\pm$ 0.04 ^{Aa}	0.96 $\pm$ 0.02 ^{Ba}	1.07 $\pm$ 0.04 ^{Aa}
	7	0.73 $\pm$ 0.02 ^{Bb}	0.76 $\pm$ 0.03 ^{Bb}	0.90 $\pm$ 0.01 ^{Ab}	0.74 $\pm$ 0.01 ^{Bb}	0.90 $\pm$ 0.03 ^{Ab}
	14	0.68 $\pm$ 0.02 ^{Bb}	0.68 $\pm$ 0.01 ^{Bc}	0.78 $\pm$ 0.01 ^{Ac}	0.67 $\pm$ 0.02 ^{Bc}	0.80 $\pm$ 0.01 ^{Ac}
	21	0.52 $\pm$ 0.02 ^{Bc}	0.53 $\pm$ 0.02 ^{Bd}	0.68 $\pm$ 0.01 ^{Ad}	0.49 $\pm$ 0.03 ^{Bd}	0.64 $\pm$ 0.02 ^{Ad}
Grape juice	1	0.98 $\pm$ 0.01 ^{CDa}	1.02 $\pm$ 0.01 ^{Aba}	1.04 $\pm$ 0.01 ^{Aa}	0.97 $\pm$ 0.02 ^{Da}	1.01 $\pm$ 0.02 ^{BCa}
	7	0.79 $\pm$ 0.01 ^{Bb}	0.82 $\pm$ 0.06 ^{Ab}	0.92 $\pm$ 0.01 ^{Ab}	0.73 $\pm$ 0.02 ^{Bb}	0.81 $\pm$ 0.08 ^{Ab}
	14	0.68 $\pm$ 0.01 ^{Bc}	0.71 $\pm$ 0.05 ^{Bbc}	0.79 $\pm$ 0.02 ^{Ac}	0.63 $\pm$ 0.01 ^{Bc}	0.67 $\pm$ 0.01 ^{Bc}
	21	0.51 $\pm$ 0.01 ^{Bd}	0.55 $\pm$ 0.09 ^{ABc}	0.65 $\pm$ 0.01 ^{Ad}	0.50 $\pm$ 0.01 ^{Bd}	0.52 $\pm$ 0.04 ^{Bd}

Control: fruit juice without added freeze-dried *Lactobacillus* cells; A-E: different superscript capital letters in the same row for the same fruit juice but containing freeze-dried cells of different *Lactobacillus* strains denotes differences ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test; a-d: different superscript small letters in the same column for the same fruit juice at different storage time intervals denotes difference ($p \leq 0.05$), based on Tukey's test. Survival rate (N/N0), where N is the viable count (log cfu/mL) in fruit juices with the freeze-dried cells at each monitored storage time interval, and N0 is the viable count in the same fruit juices immediately after the incorporation of the freeze-dried cells.

Table S1. Values of physicochemical parameters (average $\pm$ standard deviation; n = 6) of apple, orange and grape juices with and without added freeze-dried cells of *L. plantarum* 49, *L. brevis* 59, *L. paracasei* 108, *L. fermentum* 111 and *L. pentosus* 129 during 21 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).

Parameters	Days of storage	Control	<i>L. plantarum</i> 49	<i>L. brevis</i> 59	<i>L. paracasei</i> 108	<i>L. fermentum</i> 111	<i>L. pentosus</i> 129
Apple juice							
Titratable acidity (% malic acid)	1	0.65 $\pm$ 0.01Aa	0.64 $\pm$ 0.00Aa	0.64 $\pm$ 0.0Aa	0.63 $\pm$ 0.01Aa	0.62 $\pm$ 0.00Ab	0.62 $\pm$ 0.00Ab
	14	0.65 $\pm$ 0.02Aa	0.65 $\pm$ 0.01Aa	0.61 $\pm$ 0.05Aa	0.64 $\pm$ 0.01Aa	0.62 $\pm$ 0.00Ab	0.63 $\pm$ 0.01Aab
	21	0.65 $\pm$ 0.01Aa	0.64 $\pm$ 0.00Ba	0.66 $\pm$ 0.00Aa	0.66 $\pm$ 0.00Aa	0.68 $\pm$ 0.00Aa	0.67 $\pm$ 0.01Aa
pH	1	3.34 $\pm$ 0.00Ab	3.28 $\pm$ 0.00Bb	3.17 $\pm$ 0.02Cb	3.26 $\pm$ 0.00Bb	3.18 $\pm$ 0.01Cb	3.15 $\pm$ 0.01Cb
	14	3.36 $\pm$ 0.01Ab	3.29 $\pm$ 0.02Bb	3.21 $\pm$ 0.01Cb	3.23 $\pm$ 0.00Bb	3.15 $\pm$ 0.03Cb	3.19 $\pm$ 0.01Cb
	21	3.38 $\pm$ 0.00Ba	3.38 $\pm$ 0.01Ba	3.36 $\pm$ 0.01Ca	3.35 $\pm$ 0.00Ca	3.41 $\pm$ 0.00Aa	3.38 $\pm$ 0.00BCa
Total Soluble Solids (°Brix)	1	11.37 $\pm$ 0.05Ba	11.47 $\pm$ 0.05Aa	10.83 $\pm$ 0.12Cb	11.17 $\pm$ 0.05Bb	10.87 $\pm$ 0.05Cb	11.00 $\pm$ 0.00Cb
	14	11.40 $\pm$ 0.03Aa	11.47 $\pm$ 0.01Aa	10.80 $\pm$ 0.08Cb	11.20 $\pm$ 0.04Ab	10.83 $\pm$ 0.05Cb	11.03 $\pm$ 0.05Bb
	21	11.53 $\pm$ 0.05ABa	11.43 $\pm$ 0.09Ba	11.53 $\pm$ 0.09Aa	11.43 $\pm$ 0.05Ba	11.73 $\pm$ 0.05Aa	11.77 $\pm$ 0.09Aa
Viscosity	1	1.92 $\pm$ 0.00Cb	1.91 $\pm$ 0.01Cb	1.90 $\pm$ 0.02Cb	1.97 $\pm$ 0.00Aa	1.94 $\pm$ 0.01Bb	1.93 $\pm$ 0.00Ba
	14	1.92 $\pm$ 0.01Bb	1.91 $\pm$ 0.02Bb	1.92 $\pm$ 0.00Bb	1.96 $\pm$ 0.00Aa	1.95 $\pm$ 0.00Ab	1.93 $\pm$ 0.00Ba
	21	1.97 $\pm$ 0.00Ba	1.93 $\pm$ 0.01Ca	1.94 $\pm$ 0.00Ca	1.93 $\pm$ 0.00Db	1.99 $\pm$ 0.00Aa	1.92 $\pm$ 0.02Cb
ΔE	1	-	-	-	-	-	-
	14	5.72 $\pm$ 0.02Ba	4.11 $\pm$ 0.01Ca	4.10 $\pm$ 0.06Cb	2.91 $\pm$ 0.05Da	1.98 $\pm$ 0.03Ea	7.38 $\pm$ 0.01Aa
	21	4.85 $\pm$ 0.03Bb	3.98 $\pm$ 0.02Cb	4.75 $\pm$ 0.02Ba	1.73 $\pm$ 0.05Db	1.86 $\pm$ 0.02Db	6.85 $\pm$ 0.02Ab
Orange juice							
Titratable acidity (% citric acid)	1	1.24 $\pm$ 0.00Aa	1.24 $\pm$ 0.00Aa	1.16 $\pm$ 0.00Ba	1.23 $\pm$ 0.01Aa	1.10 $\pm$ 0.00Ca	1.24 $\pm$ 0.00Ab
	14	1.20 $\pm$ 0.00Aa	1.22 $\pm$ 0.02Aa	1.15 $\pm$ 0.01Ba	1.20 $\pm$ 0.00Aa	1.10 $\pm$ 0.00Ca	1.23 $\pm$ 0.01Ab
	21	1.09 $\pm$ 0.01Cb	1.26 $\pm$ 0.00Aa	1.17 $\pm$ 0.01Ba	1.09 $\pm$ 0.01Cb	1.09 $\pm$ 0.01Ca	1.27 $\pm$ 0.01Aa
pH	1	3.62 $\pm$ 0.01Aa	3.60 $\pm$ 0.00Ba	3.63 $\pm$ 0.01Aa	3.61 $\pm$ 0.00Ab	3.65 $\pm$ 0.02Aa	3.59 $\pm$ 0.03Ba
	14	3.62 $\pm$ 0.02Ba	3.58 $\pm$ 0.02Ca	3.59 $\pm$ 0.03BCa	3.59 $\pm$ 0.02BCb	3.66 $\pm$ 0.01Aa	3.57 $\pm$ 0.02Ba
	21	3.63 $\pm$ 0.00Aa	3.49 $\pm$ 0.01Cb	3.53 $\pm$ 0.01Bb	3.64 $\pm$ 0.02Aa	3.67 $\pm$ 0.01Aa	3.55 $\pm$ 0.02Ba
Total Soluble Solids (°Brix)	1	11.50 $\pm$ 0.00Aa	11.63 $\pm$ 0.05Aa	11.50 $\pm$ 0.22Aa	11.47 $\pm$ 0.05Aa	11.10 $\pm$ 0.00Ba	11.37 $\pm$ 0.19Aa
	14	11.47 $\pm$ 0.04Ca	11.63 $\pm$ 0.05Aa	11.53 $\pm$ 0.05Ba	11.47 $\pm$ 0.03Ca	11.13 $\pm$ 0.04Da	11.36 $\pm$ 0.05Ca
	21	10.87 $\pm$ 0.05Bb	11.03 $\pm$ 0.05Ab	10.77 $\pm$ 0.05Bb	11.07 $\pm$ 0.05Ab	11.00 $\pm$ 0.00Ab	11.07 $\pm$ 0.00Ab
Viscosity	1	1.98 $\pm$ 0.00Db	1.99 $\pm$ 0.00Cb	1.92 $\pm$ 0.00Eb	2.10 $\pm$ 0.00Bb	1.98 $\pm$ 0.00Db	2.12 $\pm$ 0.00Ab
	14	2.00 $\pm$ 0.01Bb	2.07 $\pm$ 0.05Bb	2.08 $\pm$ 0.02Bb	2.12 $\pm$ 0.00Ab	2.00 $\pm$ 0.01Bb	2.11 $\pm$ 0.00Ab
	21	2.27 $\pm$ 0.00Da	2.43 $\pm$ 0.00Ca	2.94 $\pm$ 0.00Aa	2.43 $\pm$ 0.01Ca	2.15 $\pm$ 0.00Ea	2.52 $\pm$ 0.00Ba
ΔE	1	-	-	-	-	-	-
	14	7.21 $\pm$ 0.04Cb	3.26 $\pm$ 0.06Eb	4.32 $\pm$ 0.10Db	11.07 $\pm$ 0.05Aa	2.34 $\pm$ 0.02Fb	10.04 $\pm$ 0.03Bb

	21	7.80±0.03Ca	2.14±0.02Fa	4.90±0.08Da	10.19±0.01Bb	3.31±0.02Ea	10.73±0.06Aa
Grape juice							
Titratable acidity (%tartaric acid)	1	1.24±0.00BCb	1.22±0.00Ca	1.27±0.01ABa	1.25±0.01ABCa	1.28±0.00Aa	1.28±0.00Aa
	14	1.22±0.04Bb	1.21±0.00Ba	1.24±0.00Aa	1.22±0.01Ba	1.28±0.03Aa	1.29±0.00Aa
	21	1.32±0.00Aa	1.21±0.01ABa	1.21±0.01ABb	1.18±0.00ABb	1.30±0.01Aa	1.04±0.00Bb
pH	1	3.14±0.01Aa	3.13±0.03Aa	3.12±0.01Aa	2.99±0.02Bb	3.08±0.03Aa	2.91±0.01Cb
	14	3.10±0.00Aa	3.11±0.03Aa	3.11±0.04Aa	2.87±0.05Bb	3.10±0.06Aa	2.94±0.00Bb
	21	3.06±0.03Ab	3.09±0.02Ab	3.10±0.03Aa	3.11±0.02Aa	3.11±0.01Aa	3.13±0.02Aa
Total Soluble Solids (°Brix)	1	14.40±0.00Cdb	14.37±0.05Da	14.40±0.08CDa	14.57±0.05ABa	14.53±0.05BCa	14.70±0.00Aa
	14	14.42±0.08BCb	14.37±0.05Ba	14.41±0.01ABa	14.60±0.08Ca	14.58±0.05Ca	14.67±0.05Aa
	21	14.67±0.09Aa	14.37±0.25Aa	14.43±0.12Aa	14.40±0.00Aa	14.70±0.08Aa	14.33±0.09Aa
Viscosity	1	2.08±0.00Ab	1.88±0.00Eb	1.93±0.00Db	2.02±0.00Cb	2.07±0.00Bb	2.07±0.00Bb
	14	2.11±0.00Ab	1.80±0.00Cb	1.94±0.00Bb	2.06±0.00Ab	2.05±0.00Ab	2.09±0.00Ab
	21	2.14±0.00Da	2.26±0.00Aa	2.17±0.00Ca	2.24±0.00Ba	2.17±0.00Ca	2.24±0.00Ba
ΔE	1	-	-	-	-	-	-
	14	3.24±0.01Bb	1.85±0.04Cb	6.02±0.02Ab	3.97±0.08Bb	6.10±0.03Aa	2.08±0.04Cb
	21	4.29±0.06Ca	3.97±0.03Da	8.03±0.01Aa	4.67±0.05Ca	5.66±0.02Bb	3.61±0.04Da

(-): not measured; Control: fruit juice without added freeze-dried *Lactobacillus* cells; ^{A-E}: different superscript capital letters in the same row for the same fruit juice with freeze-dried cells of different *Lactobacillus* strains denote differences ($p \leq 0.05$) among the values, based on Tukey test; ^{a-b}: different superscript small letters in the same column for the same juice and monitored physicochemical parameter denote difference ($p \leq 0.05$) among the values, based on Tukey test.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento deste estudo permitiu identificar diferentes espécies de BAL em subprodutos do processamento de polpa de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), manga (*Mangifera indica* L.), acerola (*Malpighia emarginata*), caju (*Anacardium occidentale*), graviola (*Annona muricata*), morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) e goiaba (*Psidium guajava*). O uso da técnica de MALDI-TOF permitiu uma identificação rápida e eficaz das espécies estudadas, o que foi posteriormente confirmado pela análise de 16S rRNA. Quando o potencial probiótico das cepas de *Lactobacillus plantarum* 49, *Lactobacillus brevis* 59, *Lactobacillus paracasei* 108, *Lactobacillus fermentum* 111 e *Lactobacillus pentosus* 129 foi estudado, identificaram-se propriedades que podem ser exploradas pela indústria, sejam como cultivos iniciadores em alimentos, na produção de antimicrobianos ou ainda em processos fermentativos diversos.

O processo de liofilização das cepas pareceu afetar a viabilidade ao longo do armazenamento, especialmente do *Lactobacillus pentosus* 129, podendo ser melhor estudado para aplicações futuras. Quando inseridas em sucos de frutas, as cepas liofilizadas, no geral, não afetaram as características físico-químicas dos sucos de fruta comerciais avaliados. Especialmente *Lactobacillus plantarum* 49 e *Lactobacillus paracasei* 108 apresentaram melhor desempenho nos sucos, indicando a necessidade de um estudo mais profundo do potencial probiótico dessas cepas *in vitro* e *in vivo*, bem como a avaliação das alterações sensoriais quando inseridos em sucos de frutas ou outras matrizes alimentares.

O desenvolvimento deste estudo também permitiu a criação de um banco de cepas de BAL, as quais poderão ser exploradas para o estudo de outras propriedades do potencial probiótico bem como avaliação para aplicação em processos fermentativos ou na síntese de substâncias de interesse para indústria alimentícia ou farmacêutica.