



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JÉSSICA DA SILVA GUEDES

**POTENCIAL CRIOPROTETOR DA β -GLUCANA DE LEVEDURA DESCARTADA
EM CERVEJARIAS EM CULTURAS DE *LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS**

JOÃO PESSOA

2019

JÉSSICA DA SILVA GUEDES

**POTENCIAL CRIOPROTETOR DA β -GLUCANA DE LEVEDURA DESCARTADA
EM CERVEJARIAS EM CULTURAS DE *LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS**

JOÃO PESSOA

2019

JÉSSICA DA SILVA GUEDES

**POTENCIAL CRIOPROTETOR DA β -GLUCANA DE LEVEDURA DESCARTADA
EM CERVEJARIAS EM CULTURAS DE *LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marciane Magnani

Co-orientadora: Prof. Dr^a Estefânia Fernandes Garcia

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G924p Guedes, Jéssica da Silva.
Potencial crioprotetor da b-glucana de levedura
descartada em cervejarias em culturas de *Lactobacillus*
probióticos / Jéssica da Silva Guedes. - João Pessoa,
2019.
69 f.

Orientação: Marciane Magnani.
Coorientação: Estefânia Fernandes Garcia.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. *Lactobacillus acidophilus*. 2. *Lactobacillus*
plantarum. 3. crioprotetores. 4. frutooligossacarídeos.
5. glucana. I. Magnani, Marciane. II. Garcia, Estefânia
Fernandes. III. Título.

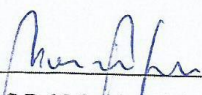
UFPB/BC

JÉSSICA DA SILVA GUEDES

POTENCIAL CRIOPROTETOR DA β -GLUCANA DE LEVEDURA DESCARTADA
EM CERVEJARIAS EM CULTURAS DE *LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS

Dissertação aprovada em 17/05/2019

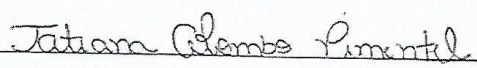
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Marciane Magnani - DEA/CT/UFPB
Orientadora-Coordenadora da Banca Examinadora

Profª Drª Estefânia Fernandes Garcia- DG/CTDR/UFPB
Co-orientadora

Profª Drª Janeeyre Ferreira Maciel - DEA/CT/UFPB
Examinador Externo



Profª Drª Tatiana Colombo Pimentel -IFPR
Examinador Externo

A Deus por me permitir viver essa experiência única,
sempre estar ao meu lado e por ser o meu refúgio. À
minha avó Isabel por todo o carinho e amor gratuito em
todos esses anos da minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o meu abrigo, por me dar coragem e esperança e discernimento nos momentos de tomar as difíceis decisões e por colocar em minha vida pessoas tão maravilhosas que me ajudaram a levantar sempre que caí.

À minha família, por me suportarem, por sempre apoiar minhas decisões, ainda que de longe. Agradeço pelo amor e carinho, e também por permitir que eu crescesse em um lar do qual eu possa me encher de orgulho sempre.

Ao Diêgo Oliveira e a Aline Barros, os irmãos que a vida me deu. Obrigada por todo o apoio e carinho, por me fazer ir em frente quando eu quis parar e me colocarem de volta no caminho que eu queria quando eu me desviei.

À minha orientadora, Prof^a Marciane Magnani. Sou-lhe muito grata por ter me aceitado como orientanda, ainda que por engano. Nesses dois anos, seus ensinamentos e seus conselhos foram muito valiosos e eu posso dizer que eu aprendi muito sob sua orientação. Obrigada pela confiança, por entender minhas decisões na reta final do mestrado e por me mostrar novas oportunidades.

À Prof^a Estefânia Garcia, pela sua contribuição generosa e paciente no desenvolvimento desse trabalho, pela disposição e por todos os conselhos que esclareceram tantas dúvidas durante o mestrado.

À Prof^a Tatiana Colombo Pimentel, Prof^o Evandro Leite de Souza, Prof^a Janeeyre Maciel por cederem espaço em seus laboratórios para realização dos experimentos, por todo o suporte dado para desenvolver esse trabalho, pela colaboração com os resultados, e pela solicitude sempre que precisei.

Às minhas companheiras de mestrado, Gabriela Gonçalves e Flávia Helena. Entramos juntas no laboratório, e vivemos experiências similares quase que ao mesmo tempo. Foram muitas lamentações e também muitas alegrias compartilhadas, em um entendimento mútuo que eu só tive com vocês. Eu não tenho palavras para dizer o quanto vocês fizeram diferença durante esses dois anos.

Aos meus amigos Aline Rodrigues, Jackson Diael, Maricéu Montenegro, Matheus Carvalho, e Winnie Alencar. O que eu faria sem vocês?! Muito obrigada pela amizade, pelo carinho, pela torcida e pelas longas reflexões. Sempre soube que eu qualquer 10 minutos de conversa eu poderia encarar os meus problemas de uma forma completamente diferente, sem me perder.

Às minhas amigas do mestrado Darlinne Amanda, Karol Lima, Miriane Fernandes, Tammyrys Dantas e Thais Santana, que agora são doutorandas. O mestrado me proporcionou inúmeras coisas boas, e entre elas a nossa amizade. Obrigada por me permitir conhecer vocês.

Aos meus amigo e colegas do laboratório de processos microbianos, Adma Melo, Dani Schabo, Geany Targino, Helena Diniz, Iara Louise, Isa Portella, Ítalo Rodrigues, Janaina Sousa, Janne Moraes, Elvira Chaves, Keyth Sulamita, Laênia Lopes, Myrella Cariri, Rayssa Carvalho, Viviane Barros, Whyara Costa, pela cooperação, pela amizade, pelos ensinamentos, que não foram poucos, pelas conversas descontraídas que tornaram o meu dia a dia no laboratório mais leve.

À Erika Tayse, por todo o suporte na realização das minhas análises, pela disposição e por responder todas as dúvidas que tive durante nosso tempo trabalhando em conjunto.

A todos os técnicos de laboratório e servidores da UFPB que prestaram auxílio em diversos momentos do meu mestrado por inúmeras razões. Muito obrigada pela atenção, e por suportarem todo o trabalho que eu dei e por me ajudarem a solucionar meus problemas.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de cursar o mestrado, bem como a todos os professores membro do programa, pelos ensinamentos durante o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Por fim, agradeço a todos (inclusive aqueles que eu possa ter esquecido) que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa, ou me apoiaram indiretamente durante esses dois anos. Muito obrigada!

RESUMO

A liofilização é um método amplamente utilizado na conservação de culturas probióticas aplicadas na indústria de alimentos. Porém, esse processo causa danos às células reduzindo sua viabilidade durante o armazenamento e pode comprometer sua funcionalidade fisiológica de exercer benefícios ao hospedeiro. O uso de carboidratos tem sido empregado como estratégia para proteger as células de probióticos durante a liofilização. A β -glucana é um homopolímero de glicose conhecido pelas propriedades bioativas que pode ser obtido a partir de levedura descartada em processos biotecnológicos. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial da β -glucana obtida de levedura (Y β G) descartada após produção de cerveja como um agente protetor de três culturas de *Lactobacillus* probióticos (*L. acidophilus* LA-05, *L. plantarum* 49, e *L. plantarum* 201) durante a liofilização, armazenamento refrigerado e exposição às condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI). A integridade da membrana e a ultraestrutura das células liofilizadas com e sem Y β G também foi avaliada. Frutooligossacarídeo (FOS), um reconhecido crioprotetor foi utilizado para fins de comparação e solução salina foi usada como controle. A Y β G mostrou efeito protetor e similar aquele obtido com o FOS durante a liofilização, armazenamento por 90 dias e exposição às condições do TGI para todas as cepas probióticas ensaiadas. O efeito da Y β G durante o armazenamento e TGI variou entre as cepas testadas, sendo os melhores resultados observados nos ensaios com a cepa *L. plantarum* 201. As amostras liofilizadas em solução salina apresentaram redução de até 4 log UFC/g, bem como os maiores percentuais de células com membrana danificada. As micrografias das células de *L. plantarum* 201 liofilizadas mostraram que a cepa aderiu à β -glucana e produziu exopolissacarídeo. Os resultados demonstram que β -glucana extraída de levedura descartada em cervejarias pode ser usada como crioprotetor de lactobacilos durante a liofilização, armazenamento refrigerado de até 90 dias e quando expostas as condições simuladas do TGI apresentando potencial aplicação como ingrediente alimentar funcional.

Palavras-chave: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, crioprotetores, frutooligossacarídeos, glucana.

ABSTRACT

Freeze-drying is a widely used method to protect probiotic cultures applied in the food industry. However, that process damages the cells by decreasing their viability during storage and may compromise their physiological functionality of exerting benefits to the host. The use of carbohydrates has been used as a strategy to protect probiotic cells during freeze-drying. The β -glucan is a homopolymer of glucose well-known for bioactive properties which can be obtained from discarded yeast in biotechnological processes. The aim of this study was to evaluate the potential of β -glucan extracted from spent brewer yeast (Y β G) as a protective agent of three probiotic cultures of *Lactobacillus* (*L. acidophilus* LA-05, *L. plantarum* 49, and *L. plantarum* 201) during freeze-drying, refrigerated storage and exposure to simulated conditions of the gastrointestinal tract (SGIT). The integrity of the membrane and the ultrastructure of freeze-dried cells with and without Y β G were also evaluated. Fructo-oligosaccharide (FOS), a recognized as cryoprotectant, was used for comparison purposes and saline solution was used as control. Y β G showed protective effect and similar effect to that obtained with FOS during freeze-drying, storage of 90 days and exposure to SGIT conditions in all probiotic strains tested. The effect of Y β G during storage and SGIT varied among the strains tested, with the best results observed in the assays with *L. plantarum* 201. Freeze-dried samples with saline solution showed a reduction of up to 4 log CFU / g, as well as the highest percentage of cells with damaged membrane. Micrographs of freeze-dried cells of *L. plantarum* 201 showed the strain adhered to β -glucan and produced exopolysaccharide. The results show that β -glucan extracted from discarded yeast in breweries can be used as a cryoprotectant of lactobacilli strains during freeze-drying, refrigerated storage of up to 90 days and when exposed to simulated SGIT conditions presenting potential application as a functional food ingredient.

Key-words: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, cryoprotectants, fructo-oligosaccharides, glucan.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Visão geral esquemática da parede celular de levedura	22
Figura 2.	Estrutura química da (1→3) (1→6)-β-D-glucana.	23

ARTIGO

Figure S1.	¹³ C RMN spectrum of water-insoluble (1→3)(1→6)-β-D-glucan from <i>S.cerevisiae</i> with indicated main chain carbons	61
Figure 1.	Log reduction of viable of cells of <i>L. acidophilus</i> LA-05 (A), <i>L. plantarum</i> 49 (B) and <i>L. plantarum</i> 201 (C) freeze-dried with ●: saline solution (control), ■: YβG and ▲: FOS, as a function of the time of storage at 4 °C. The error bars represent the standard deviations.....	62
Figure 2.	Log reduction of viable of cells of <i>L. acidophilus</i> LA-05 (A, D, G), <i>L. plantarum</i> 49 (B, E, H) and <i>L. plantarum</i> 201 (C, F, I) freeze-dried with ●: saline solution (control), ■: YβG and ▲: FOS, at the time 0 (A, B, C), 60 (D, E, F) and 120 (G, H, I) days of storage during <i>in vitro</i> digestion. The error bars represent the standard deviations.....	63
Figure 3.	Fluorescence density plots of <i>L. acidophilus</i> LA-05 (La05; A, B, C), <i>L. plantarum</i> 49 (Lp49; D, E, F) and <i>L. plantarum</i> 201 (Lp 201; G, H, I) in response to staining with PI immediately after freeze-drying with saline solution (A, D, G), YβG (B, E, H), and FOS (C, F, I).....	64
Figure 4.	Fluorescence density plots of <i>L. acidophilus</i> LA-05 (La05; A, B, C), <i>L. plantarum</i> 49 (Lp49; D, E, F) and <i>L. plantarum</i> 201 (Lp201; G, H, I) in response to staining with PI freeze dried with saline solution (A, D, G), YβG (B, E, H), and FOS (C, F, I) after 120 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).....	65
Figure 5.	Scanning electron micrograph of <i>L. plantarum</i> 201 immediately after freeze-dried with saline solution (A) and YβG (B).....	66

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1.	Viabile cell counts of <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-05, <i>L. plantarum</i> 49 and <i>L. plantarum</i> 201 after freeze-drying with yeast β -glucan (Y β G) or fructooligosaccharides (FOS).	67
-----------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	GÊNERO <i>LACTOBACILLUS</i> : APLICAÇÃO TECNOLÓGICA E POTENCIAL PROBIÓTICO.....	14
2.2	CRIOPROTETORES DE CULTURAS PROBIÓTICAS LIOFILIZADAS	18
2.3	β -GLUCANAS DE LEVEDURAS	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	LOCAL DA PESQUISA	26
3.1	β -GLUCANA DE LEVEDURA DESCARTADA EM CERVEJARIAS	26
3.2	CEPAS DE <i>LACTOBACILLUS</i> PROBIÓTICOS	26
3.3	LIOFILIZAÇÃO	26
3.4	CONTAGENS DE CÉLULAS VIÁVEIS E ATIVIDADE DE ÁGUA.....	27
3.5	CONTAGENS DE CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>LACTOBACILLUS</i> PROBIÓTICOS LIOFILIZADOS DURANTE A DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	28
3.6	MEDIDAS DE DANO NA MEMBRANA DE CÉLULAS DE <i>LACTOBACILLUS</i> PROBIÓTICOS LIOFILIZADAS	29
3.7	ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DAS CÉLULAS DE <i>LACTOBACILLUS</i> PROBIÓTICOS LIOFILIZADAS	30
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
	REFERÊNCIAS	31
4	RESULTADOS	41
4.1	ARTIGO.....	41
	PROTECTIVE EFFECTS OF β -GLUCAN EXTRACTED FROM SPENT BREWER YEAST DURING FREEZE-DRYING, STORAGE AND EXPOSURE TO SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITION OF PROBIOTIC LACTOBACILLI.....	41

1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2006; HILL et al., 2014). A produção de alimentos probióticos encontra-se em plena expansão, especialmente, devido à crescente demanda por parte dos consumidores por alimentos que contribuam para além da nutrição básica (CHAMPAGNE et al., 2011). Dentre as espécies de probióticos, o gênero *Lactobacillus* é amplamente reconhecido e se destaca por incluir a maioria das cepas estudadas para incorporação em alimentos (NINGTYAS et al., 2019).

A incorporação de culturas probióticas em matrizes alimentares enfrenta o desafio de manter a sobrevivência desses microrganismos durante a exposição às condições desfavoráveis impostas pelos processos industriais e armazenamento do produto (pH, temperatura, atmosfera modificada) (TRIPATHI; GIRI, 2014). Além disso, também é necessário que, após o consumo, o alimento forneça um número de células viáveis, com plena integridade das funções celulares, suficiente para exercer seus efeitos no hospedeiro (CHARNCHAI et al., 2016; SANTOS et al., 2019).

Dentre os métodos de conservação de culturas probióticas para aplicação em alimentos, a liofilização tem sido reconhecida como um dos mais adequados, uma vez que esse método possibilita a remoção de água das células sem o uso de altas temperaturas, normalmente usadas em outros métodos de secagem (IACONELI et al., 2015). A liofilização permite a estabilidade dos probióticos por tempo prolongado de armazenamento, entretanto, a formação de cristais de gelo durante o congelamento da cultura bem como a desidratação da célula pode causar danos estruturais, resultando em perda de viabilidade durante o armazenamento (TYMCZYSZYN et al., 2012). Uma estratégia para evitar a perda de viabilidade em culturas probióticas liofilizadas tem sido o uso de substâncias capazes de proteger as células de injúrias à membrana, denominadas crioprotetores (ROMANO et al., 2016a).

Várias substâncias têm sido propostas como agentes crioprotetores de culturas de *Lactobacillus* liofilizados tais como sorbitol, ácido ascórbico e leite desnatado (BAGAD et al., 2017), mono e dissacarídeos, por exemplo, sacarose, lactose, frutose e trealose (BASHOLLI-SALIHU et al., 2014), além de substâncias prebióticas, como frutooligossacarídeos (FOS, ROMANO et al., 2016a), e galactooligossacarídeos (GOS, TYMCZYSZYN et al., 2012).

Os açúcares simples são os crioprotetores mais utilizados até o momento, porém o seu uso ocasiona reduções no pH antes da etapa de congelamento, devido à liberação de ácidos orgânicos em decorrência do rápido metabolismo fermentativo dos probióticos, e essa redução de pH tem sido associada a uma perda de viabilidade devido a alterações na fluidez da membrana celular e atividade enzimática (CHAMPAGNE et al., 2011; CUI et al., 2017). Por outro lado, quando estes açúcares simples estão polimerizados na forma de carboidratos complexos podem fornecer proteção física às células e são capazes de formar um estado vítreo de baixa interação molecular, sendo considerados bons crioprotetores (CHIU et al., 2014; NAHR et al., 2015). Estudos recentes relataram o FOS como um dos protetores probióticos mais eficientes (BORA et al., 2018; LIAO et al., 2019).

β -glucanas são homopolímeros de glicose constituintes da parede celular de levedura, reconhecidos pelas propriedades bioativas, as quais estão relacionadas à estrutura do polímero. O método empregado para sua extração também pode interferir na estrutura do polímero (MAGNANI et al., 2009). Uma importante fonte de β -glucanas é a biomassa de levedura cervejeira descartada após sucessivos processos fermentativos, que geralmente é destinada à alimentação animal (FERREIRA et al., 2010). Em estudos anteriores, foi desenvolvido um método alternativo para isolar a β -glucana da parede celular de *Saccharomyces* usando sonicação e tratamentos enzimáticos (MAGNANI et al., 2009; ARAÚJO et al., 2014). A β -glucana obtida por meio do emprego deste método revelou ter ausência de toxicidade (MAGNANI et al., 2009) e apresentou efeitos imunoestimuladores e antioxidantes em humanos após consumo diário (MAGNANI et al., 2010; ARAÚJO et al., 2015). Além disso, foi observado que a β -glucana extraída de leveduras descartadas após cinco processos de fermentação pode modular a função vascular e a atividade de antiagregação (BEZERRA et al., 2017). No entanto, apesar desses relatos, o potencial de β -glucanas extraídas de levedura como crioprotetores permanece desconhecido.

Considerando estes aspectos, este estudo foi realizado para avaliar o potencial de β -glucana de levedura descartada em cervejaria como um agente protetor de culturas de *Lactobacillus* probióticos durante a liofilização, armazenamento refrigerado e digestão *in vitro*. Os danos na membrana das células probióticas após a liofilização na presença de β -glucana, bem como a ultraestrutura celular também foram avaliados. Um crioprotetor estabelecido (Frutooligossacarídeo, FOS) foi usado para comparação, e solução salina (SS) foi usada como controle.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GÊNERO *LACTOBACILLUS*: APLICAÇÃO TECNOLÓGICA E POTENCIAL PROBIÓTICO

O gênero *Lactobacillus* pertence a um grupo heterogêneo de microrganismos Gram positivos, não formadores de esporos, não móvel, microaerófilos, na forma de bacilos que produzem ácido lático como principal produto final da fermentação de carboidratos (SAUER et al., 2017). Bactérias desse gênero podem ser encontradas amplamente distribuídas na natureza em decorrência de sua capacidade de metabolizar diferentes substratos, colonizando diferentes habitats (GIRAFFA; CHANISHVILLI; WIDYASTUTI, 2010). Diversas espécies de *Lactobacillus* têm sido amplamente utilizadas como culturas *starter* na fermentação de produtos vegetais, lácteos e cárneos (BENSCH et al., 2014). O gênero também inclui a maioria das cepas probióticas disponível comercialmente e estudadas para incorporação em matrizes alimentares (CHAMPAGNE et al., 2011; HOWARTH; WANG, 2013; MARTINS et al., 2018). As espécies *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*, destacam-se entre os principais probióticos comercializados mundialmente (VIJAYA KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

Os probióticos são microrganismos vivos que depois de consumidos conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Para específicas alegações de saúde, os alimentos devem garantir uma contagem de células viáveis eficaz no final da vida de prateleira do produto, que pode variar entre as cepas (FAO, 2002; HILL et al., 2014).

Em alimentos, os lactobacilos são normalmente encontrados em produtos lácteos fermentados. As espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* causam uma rápida diminuição do pH na matéria-prima devido à produção de ácidos como resultado do metabolismo homofermentativo ou heterofermentativo (BRIZUELA et al., 2019; MANTZOURANI et al., 2019). Ainda podem apresentar elevada atividade proteolítica e produção de exopolissacarídeos (EPS) que são relevantes parâmetros para aumentar seu uso em aplicações biotecnológicas (STOYANOVA et al., 2012). A geração de peptídeos e aminoácidos e a liberação de ácidos graxos livres por meio das atividades proteolítica e lipolítica de *Lactobacillus* spp. desempenham um papel importante no desenvolvimento do sabor em produtos fermentados (FRAU et al., 2016). Por sua vez, os EPS produzidos por lactobacilos atuam favorecendo a adesão da célula às superfícies, e sua produção tem uma

importante contribuição tecnológica relacionada à textura de produtos lácteos, pois melhora a estabilidade e diversas propriedades reológicas (XU et al., 2019).

A síntese de ácidos orgânicos, como o lático e acético como resultado do processo fermentativo também permite a aplicação dessas bactérias como agentes biopreservantes em alimentos devido a sua ação antagonista (PRABHURAJESHWAR; CHANDRAKANTH, 2017; COSTA et al., 2018b; MUÑOZ et al., 2019). Com a redução do pH, os ácidos orgânicos produzidos conseguem exercer efeito inibitório contra bactérias patogênicas e deterioradoras em alimentos, além de modificar o sabor e aroma, possibilitando a produção de alimentos sensorialmente atrativos (ZHENG et al., 2016; DAS; CHOUDHARY; THOMPSON-WITRICKB, 2019). Costa et al. (2018b) avaliaram o efeito antagonista de *Lactobacillus* isolados de frutas frente a patógenos presentes em queijo minas frescal e carne de frango, observando que as cepas *L. plantarum* 49 e *L. paracasei* 108 reduziram 2,8 log UFC/g e 1,5 log UFC/g, respectivamente, na contagem de células viáveis de *Listeria monocytogenes* em queijo contaminado após 3 dias de armazenamento, enquanto a *L. plantarum* 201 apresentou efeito bacteriostático frente a *L. monocytogenes* na mesma matriz.

Apesar de serem amplamente encontrados em produtos lácteos fermentados, existe uma crescente busca pela inserção de *Lactobacillus* probióticos em matrizes de origem não-lácteas, devido ao aumento da conscientização do papel da dieta atrelado a benefícios de saúde além da nutrição básica. Além disso, existe uma demanda por parte dos consumidores veganos, ou que possuam algum tipo de restrição alimentar (SRISUKCHAYAKULA; CHARALAMPOPOULOS; KARATZAS, 2018).

A incorporação de *Lactobacillus* probióticos em novos produtos de origem vegetal é favorecida pelos altos teores de açúcar, vitaminas e minerais que esses produtos possuem, os quais poderiam ser usados como fonte de energia e nutrientes (DING; SHAH, 2008). Os exemplos mais comuns de alimentos vegetais incorporados de *Lactobacillus* probióticos são as frutas (RUSSO et al., 2015), sucos e outras bebidas a base de frutas (PIMENTEL et al., 2015), smoothies de frutas (LUCIANO et al., 2018) e chocolate (KONAR et al., 2018). Garcia et al. (2018), em estudo sobre a incorporação de *Lactobacillus* liofilizados em sucos de frutas, mostraram que células de *L. plantarum* 49 liofilizadas tiveram alta taxa de sobrevivência após 120 dias de armazenamento (aproximadamente 0,75) e, após ser incorporada em sucos de maçã, laranja e uva, a cepa apresentou alta tolerância aos estresses causados pela digestão *in vitro* sem influenciar parâmetros físico-químicos dos sucos (pH, acidez titulável, teor de sólidos solúveis totais) durante 14 dias de armazenamento. No

entanto, apesar do aumento de pesquisas, a incorporação de probióticos em matrizes de origem vegetal ainda enfrenta fatores limitantes, como o baixo pH dessas matrizes e a presença de compostos fenólicos, que prejudicam a sobrevivência dos probióticos (SRISUKCHAYAKULA; CHARALAMPOPOULOS; KARATZAS, 2018).

O consumo de probióticos tem sido associado à manutenção da saúde gastrointestinal, ou a benefícios sistêmicos contribuindo para o bem-estar geral do organismo (DODOO et AL., 2017). Os produtos produzidos a partir da fermentação bacteriana no cólon exercem uma série de efeitos benéficos, incluindo o alívio da constipação, redução do nível de glicose no sangue, melhoria da absorção de minerais, diminuição da incidência de câncer do cólon e a modulação do sistema imunológico (GULLÓN et al., 2014).

A interação entre a microbiota intestinal e o hospedeiro gera vantagens para ambos, uma vez que a alta atividade metabólica dos microrganismos probióticos proporciona a absorção maior de substratos antes não digeridos (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015). Além disso, quando em equilíbrio, a microbiota intestinal impede a proliferação de microrganismos patógenos e seus efeitos (PRABHURAJESHWAR; CHANDRAKANTH, 2017). Neste cenário, os efeitos do consumo de *Lactobacillus* probióticos estão relacionados, principalmente, ao controle de distúrbios intestinais e modulação imunológica, mas outros benefícios resultantes do consumo de micro-organismos vêm sendo estudados (LOLLO et al., 2012).

Estudos *in vivo* demonstram que a ingestão de alimentos suplementados com *Lactobacillus* probióticos tem sido associada a uma variedade de benefícios para a saúde tais como efeito antidiabético (MIHAILOVIC et al., 2016), anti-hipertensivo (AHRÉN et al., 2015), antiobesidade (CHEN et al., 2018), antioxidante (CAO et al., 2019) e anticarcinogênico (HEYDARI; RAHAIE; ALIZADEH, 2019). No estudo de Ahrén et al., (2015), foi observada uma mudança positiva na microbiota de ratos saudáveis após a ingestão de mirtilo fermentado por *L. plantarum* DSM 15313 durante quatro semanas. Em outro estudo, Zhang et al. (2018) demonstraram que a ingestão de três cepas de *Lactobacillus* probióticos (*L. paracasei*, *L. casei* 431 e *L. fermentum* PCC) impulsionou o sistema imunológico e foram eficazes no combate a resfriados e infecções respiratórias similares em adultos.

Lactobacillus acidophilus LA-05 é uma das cepas probióticas mais comercializadas e seus efeitos relacionados à manutenção da saúde têm sido amplamente elucidados. O consumo de alimentos suplementados com *L. acidophilus* LA-05 têm sido associado a um

melhoramento da microbiota intestinal, através da redução de bactérias potencialmente patogênicas também presentes no trato intestinal (SAVARD et al., 2011; NAJARIAN; SHARIF; GRIFFITHS, 2019). Além disso, alimentos enriquecidos com *L. acidophilus* LA-05 também exercem atividades antidiabética (ETTAHED et al., 2012), antioxidante e anticolesterolêmica (MOURA et al., 2016), e anticarcinogênica (HEYDARI; RAHAIE; ALIZADEH, 2019). Moura et al. (2012) reportaram que sobremesas lácteas contendo 8 log UFC/g de *L. acidophilus* LA-05, melhorou o perfil lipídico em ratos após duas semanas de consumo regular, pela redução dos níveis de colesterol LDL e triglicerídeos e o aumento dos níveis de colesterol HDL, bem como o aumento da atividade da enzima superóxido dismutase, associada ao mecanismo de defesa antioxidante da maioria das células.

Um dos principais desafios para a atuação de probióticos no organismo é resistir à presença das secreções gástricas ácidas do estômago e dos sais biliares liberados no duodeno durante sua passagem pelo trato gastrointestinal (BLAIOTTA et al., 2013). A sobrevivência de microrganismos probióticos é fortemente influenciada pelo alimento no qual eles estão inseridos, que por sua vez, deve fornecer proteção às cepas para que elas alcancem o intestino em maior número possível (DODOO et al., 2017).

Alguns estudos têm sugerido que cepas de *Lactobacillus* isoladas de frutas apresentam elevada resistência à ação enzimática e acidez elevada do trato gastrointestinal bem como atividade antagonista frente a microrganismos patogênicos, indicando um potencial promissor para o uso dessas espécies como probióticos (DIAS et al., 2014; GARCIA et al., 2016). Costa et al. (2018a) demonstraram os benefícios de saúde das cepas *L. plantarum* 49 e *L. plantarum* 201 relacionados a capacidade de modular parâmetros bioquímicos em ratos machos saudáveis. *L. plantarum* 49 e *L. plantarum* 201 foram capazes de reduzir níveis de glicose no sangue, o colesterol total e níveis de LDL-c após 28 dias de administração. Ainda, os efeitos sobre os níveis de glicose e colesterol nos grupos de ratos que receberam *L. plantarum* 49 e *L. plantarum* 201, respectivamente, permaneceram até 14 dias após a interrupção da administração.

Dessa forma, o uso de lactobacilos probióticos na produção de alimentos é afetado por diversos fatores. Uma aplicação tecnológica adequada pode permitir o desenvolvimento de produtos funcionais, desde que as células dos probióticos permaneçam protegidas durante a fabricação, armazenamento e consumo do produto (BAKR 2015). Entretanto, a manutenção da viabilidade celular de probióticos para emprego na produção de alimentos, e ou quando da

aplicação de tecnologias de conservação ainda representa um desafio para a indústria de alimentos.

2.2 CRIOPROTETORES DE CULTURAS PROBIÓTICAS LIOFILIZADAS

Culturas probióticas têm sido adicionadas a diferentes matrizes alimentares na busca de ampliar o atendimento a crescente demanda dos consumidores por produtos saudáveis (BAKR, 2015). Do ponto de vista tecnológico é importante que as cepas probióticas destinadas à produção industrial sejam capazes de sobreviver e manter sua funcionalidade durante o processamento de alimentos e nos produtos finalmente formulados (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Em geral, as culturas são comercializadas sob a forma de produtos altamente concentrados, demandando a aplicação de processos de conservação para aumentar sua vida de prateleira, comumente produzidas na forma de culturas congeladas ou liofilizadas (DODOO et al., 2017; QUINTANA; GERBINO; ZAVAGLIA; 2017). Culturas liofilizadas têm vantagens quando comparadas às culturas congeladas, como a economia de espaço para armazenamento, conveniência no transporte e menor custo de energia para armazenamento em temperaturas ambiente e de refrigeração, o que favorece a sua comercialização direta ou a incorporação em matrizes alimentares (BASHOLLI- SALIHU et al., 2014; SHAO et al., 2014; KONAR et al., 2016; MOUMITA et al., 2018).

A liofilização inclui três etapas: o congelamento, seguido por etapas de sublimação e dessorção da água (STEPHAN; SILVA; BISUTTI, 2016). No entanto, a formação de cristais de gelo durante a etapa do congelamento, associados ao estresse osmótico e a desestabilização de estruturas bacterianas como membranas, proteínas estruturais e enzimas ocasionadas pela remoção da água podem danificar a célula e comprometer a viabilidade das culturas após a liofilização (BROECKX et al., 2016; ROMANO et al. 2016a).

A estabilidade dos microrganismos probióticos durante a liofilização e armazenamento pode ser aumentada por diversas estratégias de proteção incluindo o controle dos parâmetros do processo de liofilização (BROECKX et al., 2016), o condicionamento pré-estresse das cepas bacterianas antes do congelamento (BRAVO FERRADA et al., 2015), mudanças nas condições de fermentação dos probióticos, condições de armazenamento e pela adição de crioprotetores (BARBOSA et al., 2015; AMPATZOGLOU, 2010).

Crioprotetores são substâncias que, quando adicionadas ao meio de secagem antes da

liofilização, ajudam a proteger as células de microrganismos durante o processo e armazenamento (TRIPATHI; GIRI, 2014). Geralmente, os crioprotetores contêm dissacarídeos não redutores, alcoóis de açúcar, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, glicerol, lactose e leite desnatado, ou ainda uma combinação entre essas diferentes substâncias, sendo adicionados em concentrações variáveis entre 5 e 30% (BASHOULI-SALIHU et al., 2014; BROECKX et al., 2016; DIMITRELLOU; KANDYLIS; KOURKOUTAS, 2016; BAGAD et al., 2017).

Particularmente, os carboidratos podem prevenir as conseqüências prejudiciais da perda de integridade da membrana por meio da vitrificação, isto é, à medida que a água é removida da suspensão bacteriana, os protetores nesta suspensão se concentrarão, favorecendo a formação de um estado amorfo vítreo, rígido, de alta viscosidade e baixa mobilidade, que confere estabilidade química e física (GRASMEIJER et al., 2013; ASCHENBRENNER et al., 2014; MENSINK et al., 2017). O efeito da água na estabilidade do estado sólido dos sistemas vítreos é complexo. Quando na presença de baixos teores de umidade, há uma maior estabilidade celular, uma vez que a exposição de um carboidrato amorfo a alta umidade ou a temperaturas acima da temperatura de transição vítrea, que se relacionam diretamente com a organização estrutural das moléculas de uma dada matriz, resulta em perda subsequente do efeito estabilizante do estado vítreo que garante a proteção à célula (PASSOT et al. 2012; WENG et al., 2016).

Outra hipótese para explicar a ação protetora de carboidratos é a sua interação direta com os componentes da membrana celular. Na presença de açúcares, os lipídeos presentes na membrana são capazes de manter o seu estado cristalino líquido correspondente ao de lipídeos hidratados, preservando a permeabilidade da bicamada lipídica (TORRES et al., 2011). A bicamada lipídica da membrana celular é organizada com as regiões apolares dos fosfolipídios voltadas para a região hidrofóbica enquanto a cabeça polar é alinhada com a região em contato com a água, e estabilizada por um balanço entre forças de van der Waals e a repulsão da hidratação (GARVEY et al., 2013; WATANABE; SUGA; UMAKOSHI, 2019). Durante a liofilização os lipídios da membrana são comprimidos e a proximidade dos grupos polares pode causar danos que acarretam no vazamento do conteúdo celular (WENG; ZIAEI; ELLIOTT, 2016).

A interação entre oligo e polissacarídeos com membranas lipídicas depende da flexibilidade estrutural da molécula, que está relacionada ao seu grau de polimerização. Os oligossacarídeos com maiores graus de polimerização são capazes de interagir com

membranas lipídicas, exercendo, assim, efeitos protetores frente a processos que causam injúrias nas células bacterianas (ROMANO et al., 2016a).

Já o efeito dos açúcares sobre as proteínas está associado às ligações de hidrogênio com moléculas de água (MENSINK et al., 2017). As regiões polares podem interagir diretamente com os grupos hidroxila presentes nos sacarídeos, em substituição dos grupos hidroxilas da água, e assim através dessa substituição é possível manter a configuração original das proteínas (MENSINK et al., 2015).

Dentre os carboidratos, o uso de frutooligossacarídeo como protetor de espécies de *Lactobacillus* tem sido indicado (ROMANO et al., 2016a; BORA et al., 2018; LIAO et al., 2019). Os frutooligossacarídeos são prebióticos reconhecidos, quimicamente constituídos por oligossacarídeos de cadeia pequena formados por unidades de frutose unidas por ligações glicosídicas em $\beta(2\rightarrow1)$ e podem ser obtidos pela síntese a partir da sacarose (ROMANO et al., 2016b). No estudo realizado por Bora et al. (2018), FOS foram utilizados em combinação com isolado protéico para encapsular *L. acidophilus* e *L. casei* submetidos ao processo de liofilização, o que permitiu maior sobrevivência das cepas após o armazenamento refrigerado, quando comparado com as células liofilizadas livres e maior estabilidade quanto à exposição das bactérias às condições gastrointestinais simuladas.

Recentemente, têm-se discutido sobre o potencial de polissacarídeos altamente polimerizados e fibras como agentes protetores de microrganismos liofilizados. Essas substâncias aumentam a fração não congelada da matriz a ser liofilizada garantindo maior espaço para as células de probióticos e reduzindo os danos causados por estresses mecânicos e osmóticos (CHOTIKO; SHATIVEL, 2014; SHU et al., 2018)

Chiu et al., (2014) investigaram o efeito protetor do polissacarídeo de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) em culturas de *Bifidobacterium longum* MYL16 durante os processos de liofilização e digestão *in vitro*, observando que a presença do polissacarídeo aumentou em 40% a taxa de viabilidade durante o armazenamento em relação às cepas liofilizadas sem a presença de protetores. Em outro estudo, Chotiko e Shativel (2014) utilizaram 10% de fibra de farelo de arroz e avaliaram seu efeito protetor durante o congelamento, liofilização e armazenamento da cepa *L. plantarum* NRRL B-4496. Seus resultados demonstraram que as células protegidas com fibra de arroz apresentaram baixas perdas de viabilidade, entre 0,7 e 1,3 log UFC/g durante 12 semanas de armazenamento refrigerado, bem como um aumento de até 5 log UFC/g da sobrevivência das células de *L. plantarum* expostas a sais biliares.

O uso da β -glucana de aveia como agente protetor de cepas probióticas foi sugerido por Guergoletto et al. (2010), que avaliaram a sobrevivência de *L. casei* (LC-1) aderido a diferentes fibras prebióticas após secagem a vácuo a 45 °C. De acordo com os autores, o uso de aveia contendo 9% de β -glucana promoveu uma maior estabilidade (7 log UFC/g) de *L. casei* quando comparado a células desidratadas na presença de sacarose e trealose, armazenadas em diversas temperaturas e durante a simulação das condições gastrointestinal, cuja presença dessa fibra significou um aumento de quase 5 log UFC/g na sobrevivência das células. Um estudo similar foi realizado por Gani et al. (2018) que analisaram a sobrevivência de cepas probióticas *L. casei*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* microencapsuladas em β -glucana extraída de cevada durante o processo de liofilização. No estudo os pesquisadores observaram uma proteção significativa aos probióticos contra a ação de temperatura severa e os estresses causados pela exposição de enzimas e pH, em condições similares ao trato gastrointestinal resultando em pequenas perdas de apenas 1 log UFC/g. Estes resultados sugerem que β -glucana de diferentes fontes podem atuar na proteção de culturas probióticas frente a estresses diversos.

2.3 β -GLUCANAS DE LEVEDURAS

β -glucanas são polímeros encontrados em vegetais, fungos filamentosos e leveduras (FESEL; ZUCARRO, 2016; TANG et al., 2017; BAI et al., 2019). Uma fonte importante de β -glucanas é a parede celular de leveduras que são microrganismos eucarióticos unicelulares, que apresentam forma variada e destacam-se pela capacidade de ajustar-se metabolicamente para a fermentação de açúcares em presença ou ausência de oxigênio, produzindo álcool e gás carbônico (STEWART, 2016). Espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces* são largamente empregadas em processos de fermentação industrial. Para a produção de cerveja, as espécies *Saccharomyces uvarum* e *Saccharomyces cerevisiae* são usualmente as mais utilizadas nos processos de baixa e alta fermentação, respectivamente (ARAÚJO et al., 2014; PINTO et al. 2015).

O aumento da produção mundial de cerveja tem como consequência um grave problema de geração de um grande volume de levedura descartada após seu uso em sucessivos processos fermentativos sendo, portanto um resíduo industrial (FERREIRA et al., 2010). Geralmente, a biomassa residual é destinada à alimentação animal, podendo ser utilizada como fonte de nutrientes, entretanto a absorção desses nutrientes pelo organismo

animal é limitada pela parede celular presente na célula da levedura, que é resistente às enzimas digestivas (FERREIRA et al., 2010; ZHU; DU, XU 2016).

A parede celular de leveduras é composta principalmente por manoproteína e β -glucanas na camada externa, e quitina na camada interna, ligadas umas às outras (ISHIMOTO et al., 2017) (Figura 1).

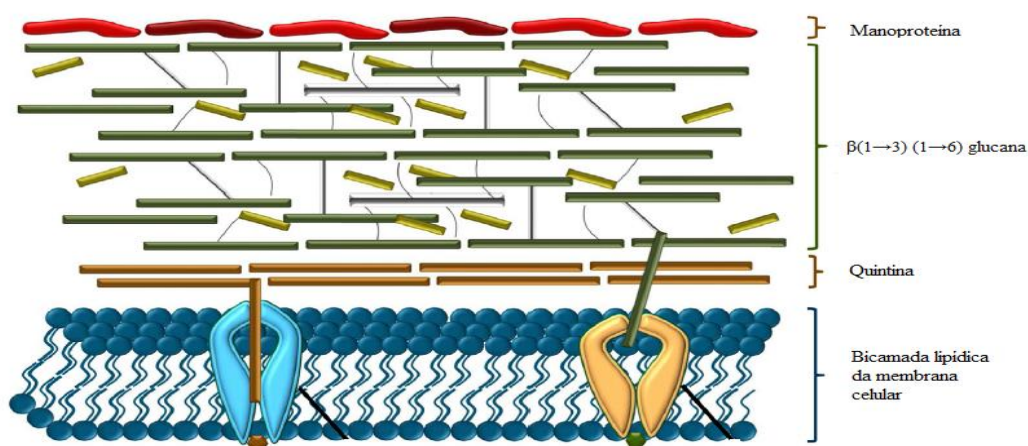


Figura 1. Visão geral esquemática da parede celular de levedura

Fonte: Adaptado de Fesel; Zucarro (2016)

As β -glucanas de leveduras são moléculas altamente ordenadas, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre os monômeros de D-glicose (anéis tipo β -D-glucopiranosose) da cadeia principal e, pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (BALDASSANO; ACCARDI; VASTO, 2017). Sua principal função na célula está ligada a manutenção da rigidez e integridade da parede celular de leveduras, tais moléculas também podem estar relacionadas a mecanismos de patogenicidade (FESEL; ZUCARRO, 2016).

Diferentes β -glucanas podem ser obtidas de diversas fontes, e frequentemente possuem estruturas e conformações primárias diferentes. A estrutura primária de β -glucanas é definida pelo tipo de ligação glicosídica, bem como pelos graus de ramificação e polimerização, enquanto sua conformação pode ser apresentar na forma de espiral aleatória, hélice única ou hélice tripla (WANG et al., 2017). Tanto a estrutura primária quanto a conformação desses polissacarídeos afetam significativamente suas atividades biológicas (JIN; LI; WANG, 2018).

Uma das características mais importante afetadas pela estrutura primária de β -glucanas é a solubilidade da molécula, que está diretamente relacionada à quantidade de ligações 1→4 e 1→6 glucana presentes na molécula e o grau de polimerização (GP); moléculas com GP maiores que 100 são geralmente completamente insolúveis em água. (DU; BIAN; XU, 2014;

FESEL; ZUCCARO, 2016). Ao contrário daquelas encontradas em leveduras, as β -glucanas de origem vegetal se diferenciam pela presença de ligações do tipo 1 $\rightarrow$ 4 entre as suas unidades, sendo em sua maioria solúveis (ZHU; DU, XU 2016).

Quanto ao gênero *Saccharomyces*, as β -glucanas representam até 30% do peso seco das células apresentando uma estrutura constituída por uma cadeia linear central de unidades de glicose ligadas na posição $\beta(1\rightarrow3)$, com diversas cadeias laterais unidas em $\beta(1\rightarrow6)$, que possuem tamanhos variáveis (MAGNANI et al., 2009) (Figura 2).

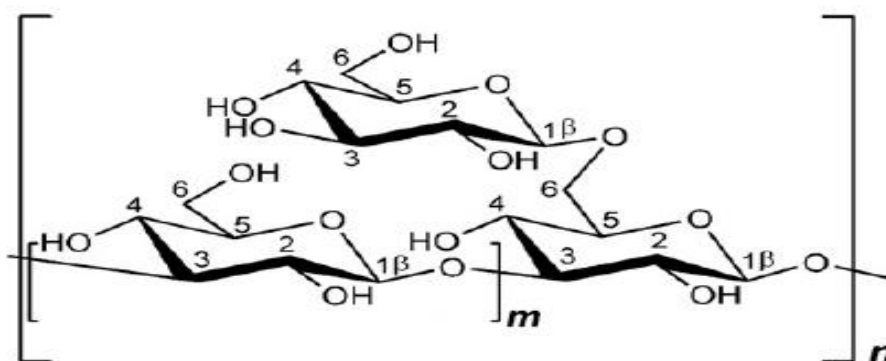


Figura 2. Estrutura química da (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucana.

Fonte: Adaptado de Synytsya; Novák (2013)

Outro fator determinante para as propriedades estruturais de β -glucanas é o processo de extração (BORCHANI et al., 2016; VARELAS et al., 2016). Zhu, Du e Xu (2016) contemplaram em sua revisão de maneira simplificada os métodos de extração mais utilizados, sendo estes: extração com água quente, com lavagens alcalinas, enzimática, assistida por ultra-som ou microondas, ou extração ácida, podendo exigir etapas de pré-tratamentos e purificação. O método de extração ideal depende das estruturas e fontes de β -glucanas (BAI et al., 2019). Magnani et al., (2009) descreveram um método otimizado para a extração de β -glucanas insolúveis de *S. cerevisiae* de alta pureza, usando sonicação e tratamento enzimático para substituir os métodos tradicionais de extração ácida e alcalina que levam à degradação das cadeias ligadas à glicose e afetam suas propriedades. Tratamentos térmicos com água e tratamentos enzimáticos vêm recebendo especial atenção, pois além de apresentarem bons rendimentos e manterem a estrutura das cadeias de glicose, esses métodos dispensam o uso de soluções ácidas e alcalinas, resultando em efluentes menos nocivos ao meio ambiente (BORCHANI et al., 2014).

O principal motivo pelo qual as β -glucanas têm despertado atenção é a sua atuação sobre o sistema imunológico, sendo consideradas substâncias modificadoras da resposta biológica apresentando inúmeros efeitos fisiológicos (FULLER et al., 2017). A atividade biológica está relacionada às características do polímero tais como tipo de ligações glicosídicas, peso molecular, conformação espacial da molécula, grau de polimerização e de ramificação (DIETRICH-MUSZALSKA et al., 2011). Além disso, a modificação química na estrutura de β -glucanas, como carboximetilação, fosforilação, acetilação e sulfonilação, também é uma ferramenta que pode aumentar a bioatividade e facilitar a aplicação tecnológica desses polímeros (WANG et al., 2017). Essas modificações aumentam a solubilidade do composto teste e favorece um aumento da afinidade entre o polissacarídeo e o receptor da célula imune e, conseqüentemente, melhora a resposta biológica (CHEN; ZHANG; CHEUNG, 2010; EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013).

Por serem moléculas não produzidas pelo organismo humano, o mecanismo de ação de β -glucanas está ligado a sua capacidade de induzir uma resposta imune (JIN; LI; WANG, 2018). β -glucanas também são capazes de produzir fatores quimiotáticos que induzem a migração de leucócitos para os locais da infecção (GRAUBAUM, 2012; KOH; DIPIETRO, 2013). Há evidências de que as glucanas exibem suas propriedades de imunomodulação, por meio de muitos mecanismos, incluindo a capacidade de ativar a leucócitos, interação com seus receptores, e sinalização para o núcleo celular, que resultam em células mais ativas durante a fagocitose, morte e digestão de bactérias, além de regular a geração de moléculas de sinalização (citocinas e quimiocinas) (NOVAK; VETVICKA, 2009; BAI et al., 2019).

Além da atividade imunomodulatória, estudos têm demonstrado que a β -glucana de leveduras apresenta outros benefícios associados à saúde, tais como os efeitos antitumoral (MO et al., 2017), antioxidante (TANG et al., 2017) anti-inflamatório (XU et al., 2012) e antimutagênico (MAGNANI et al., 2010), além de possuir ação antimicrobiana (KHAN et al., 2016). A ingestão diária de $\beta(1\rightarrow3)$ $(1\rightarrow6)$ glucana permite a redução a duração de sintomas em idosos infectados com doenças do trato respiratório (FULLER et al., 2017). β -glucana de *S. cerevisiae* também tem demonstrado atividade anticancerígena. Mo et al. (2017) avaliaram o efeito da ingestão de $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanas no tamanho de tumores em camundongos após a administração intragástrica por 16 dias, observando que a $\beta(1\rightarrow3)$ -glucana possui atividade antitumoral sem toxicidade, e ainda, a taxa de inibição tumoral dos camundongos tratados com baixas, médias e altas doses de $\beta(1\rightarrow3)$ -glucanas foi crescente quando comparada com a do grupo controle mostrando que β -glucanas suprimem o crescimento do tumor de maneira

dose-dependente. A atividade antitumoral de β -glucana de *S. cerevisiae* pode ser atribuída às suas características indutoras de apoptose celular (BAI et al., 2019).

Outro benefício que tem ganhado destaque em relação às glucanas e seus derivados é a sua atividade antioxidante (TANG et al., 2017), bem como capacidade de modular positivamente a função vascular, com respostas majoritariamente não dependentes, e possuir atividade anticoagulante plaquetária (BEZERRA et al., 2017). Han et al., (2017) relataram a atividade anti-inflamatória de β -glucana de levedura em ratos, onde a sua administração oral melhorou as alterações induzidas por destrano sulfato de sódio (um agente indutor de inflamações) em lesões inflamatórias da mucosa e na barreira intestinal por meio da inibição de mediadores inflamatórios. O consumo de β -glucana de levedura também pode prevenir danos ao DNA, que estão associados a inúmeras doenças relacionadas a danos oxidativos, incluindo o câncer (MAGNANI et al., 2011).

Apesar das diversas contribuições de β -glucana de leveduras em relação aos benefícios de saúde permitir que as mesmas sejam utilizadas pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos, ainda, pouco se sabe sobre o potencial da β -glucana de levedura como protetor de culturas probióticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DA PESQUISA

Os ensaios microbiológicos foram conduzidos no Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos (LPMA), do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA), Centro de Tecnologia (CT), Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos, do Departamento de Nutrição (DN), Centro de Ciências da Saúde, UFPB. As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Complexo de Centros de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

3.1 β -GLUCANA DE LEVEDURA DESCARTADA EM CERVEJARIAS

A β -glucana foi isolada da parede celular de levedura de cerveja (*Saccharomyces uvarum*) descartada após cinco processos fermentativos na forma de creme de levedura, usando sonicação e tratamentos enzimáticos (MAGNANI et al., 2009). A identidade do polímero foi confirmada por análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de ^{13}C e ^1H foram obtidos dissolvendo 50 mg da glucana isolada em dimetilsulfóxido (d_6 -DMSO) por um espectrômetro Varian Gemini operando a 125 MHz para ^{13}C e 500 MHz para ^1H . Os desvios químicos foram expressos em ppm em referência aos picos dos solventes.

3.2 CEPAS DE *LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS

Lactobacillus acidophilus LA-05 (Chr. Hansen SA, Valinhos, São Paulo), uma conhecida cepa probiótica, e *Lactobacillus plantarum* 49 e *Lactobacillus plantarum* 201, cepas isoladas de frutas e previamente qualificadas como probióticos (COSTA et al., 2018a) foram incluídas no estudo como cepas teste. As culturas estoque de *Lactobacillus* foram mantidas em criotubos a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, India) contendo glicerol 20 mL/100 mL (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

3.3 LIOFILIZAÇÃO

Para obter as suspensões celulares, cada cepa de *Lactobacillus* foi inoculada em caldo MRS, e incubada a 37 °C por 24 horas sob condições anaeróbicas (usando Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda, Wade Road, UK) para obter o pré-inóculo. Posteriormente, o pré inóculo foi adicionado a um novo caldo MRS (10 mL/100 mL) e re-incubado anaerobicamente a 37 °C por 24 h. As culturas foram então centrifugadas (4000 g/ 10 minutos, 4 °C), lavadas duas vezes e ressuspensas com solução salina estéril (0,85 g/100 mL) para obtenção padrão de suspensões celulares. A leitura de densidade óptica (OD_{660 nm}) foi de 1,2 para fornecer contagens viáveis de aproximadamente 9 log UFC/mL (GARCIA et al., 2018). Então, β -glucana de levedura (Y β G; 10 g/100 mL) ou frutooligossacarídeo (FOS; 10 g/100 mL), um reconhecido crioprotetor (ROMANO et al., 2016a), foram assepticamente misturadas com as suspensões celulares, enquanto solução salina (SS; 0,85 g/100 mL NaCl) foi usada como controle negativo. As suspensões contendo as células de *Lactobacillus* foram mantidas em repouso em temperatura ambiente (25 $\pm$ 2 °C) por 1 h (GUERGOLETTTO, et. al., 2010) e em seguida, foram fracionadas em alíquotas de 1 mL, assepticamente transferidas para frascos de 5 mL e congeladas a -20 °C por 24 h. A liofilização foi conduzida a -55 $\pm$ 2 °C, sob pressão inferior a 138 μ Hg a uma velocidade de 1 mm/h usando um liofilizador de bancada (modelo L-101, Liotop, São Carlos, Brasil). O processo de liofilização durou 40 h (GARCIA et al., 2018).

3.4 CONTAGENS DE CÉLULAS VIÁVEIS E ATIVIDADE DE ÁGUA

Após a liofilização, os frascos foram fechados e embalados em sacos de polipropileno biaxialmente orientado (BOPP), hermeticamente selados e armazenados sob refrigeração (4 °C). Células viáveis de *L. acidophilus* LA-05, *L. plantarum* 49, e *L. plantarum* 201 liofilizadas com Y β G, FOS e SS foram enumeradas em diferentes tempos de armazenamento, sendo eles: 0 (imediatamente após a liofilização), 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Para isto, células liofilizadas foram inicialmente reidratadas em água peptonada (0,1 g/100 mL) em temperatura ambiente durante 15 min. (SANTOS et. al., 2014). Então alíquotas de 100 μ L foram diluídas em série com solução salina (10⁻¹-10⁻⁷) e plaqueadas em ágar MRS usando a técnica de inoculação por microgota (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h sob condições anaeróbicas (usando Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) e as colônias foram enumeradas. A redução das contagens viáveis foi obtida usando log N/N₀, onde N é contagem viável (UFC/g) das células liofilizadas em

cada intervalo de tempo monitorado enquanto N_0 é a contagem viável (CFU/g) de células imediatamente após a liofilização (BARBOSA et al., 2015).

A atividade de água (a_w) das cepas de lactobacilos liofilizadas foi determinada nos mesmo intervalos de tempo do ensaio de viabilidade durante o armazenamento usando um instrumento de determinação de atividade de água (Alemmar, Labmaster- a_w , Brasil), em temperatura constante de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.5 CONTAGENS DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS LIOFILIZADOS DURANTE A DIGESTÃO *IN VITRO*

Células de *L. acidophilus* LA-05, *L. plantarum* 49 e *L. plantarum* 201 liofilizadas com YβG, FOS ou SS foram expostas a condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI) imediatamente após a liofilização, e após 60 e 120 dias de armazenamento refrigerado ($4,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$) de acordo com o método descrito por Albuquerque et al. (2017) com algumas modificações. Os experimentos foram realizados em uma incubadora a 37°C com agitação mecânica para simular os movimentos peristálticos de cada passo digestivo. Antes do ensaio, as células de *Lactobacillus* liofilizadas foram reconstituídas em 25 mL de caldo MRS por 15 min. (CHAMPAGNE et. al., 2011). A fase do esôfago-estômago foi simulada usando 25 mg de pepsina diluída em 1 mL de 0,1 mM/L HCl, adicionada a uma taxa de 0,05 mL/mL, com redução gradual do pH usando 1 mM/L HCl (pH 5,5/10 min. [passo 1]; pH 4,6/ 10 min. [passo 2]; pH 3,8/10 min. [passo 3]; pH 2,8/20 min. [passo 4]; pH 2,3/20 min. [passo 5] e pH 2,0/ 20 min. [passo 6]) sob agitação (130 rpm). A etapa do duodeno foi simulada com 2 g de pancreatina/L em 0,1 mM/L de NaHCO_3 e 12 g sais biliares em 0,1 mM/L NaHCO_3 com ajuste de pH para 5,0 usando 0,1 mM/L NaHCO_3 e exposição por 30 min. sob agitação (45 rpm, [passo 7]); e as condições do íleo foram simuladas com o ajuste do pH para 6,5 usando 0,1 mM/L NaHCO_3 , durando 60 min. de exposição sob agitação (45 rpm, [passo 8]).

As enzimas e sais de bile bovina foram adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Após cada passo da simulação, uma alíquota de 100 μL de cada cepa de *Lactobacillus* foi recolhida, diluída em série, plaqueada em ágar MRS e incubada por 48 h a 37°C sob condições anaeróbias (usando Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). A redução da contagem de células viáveis foi obtida usando $\log N/N_0$, onde N é a contagem de células viáveis (UFC/mL) das cepas liofilizadas em cada passo digestivo, e N_0 é a contagem de células

viáveis (UFC/mL) das cepas liofilizadas antes da digestão *in vitro*. O limite de detecção foi de 2 log UFC/mL.

3.6 MEDIDAS DE DANO NA MEMBRANA DE CÉLULAS DE *LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS LIOFILIZADAS

Para avaliar os danos a membrana durante a liofilização e armazenamento, células *L. acidophilus* LA-05, *L. plantarum* 49 e *L. plantarum* 201 liofilizadas com YβG, FOS e SS foram coradas com iodeto de propídio (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e analisadas pela técnica de citometria de fluxo (CF) imediatamente após a liofilização e após 120 dias de armazenamento refrigerado ($4 \pm 0,5$ °C). Os tempos analisados foram definidos para avaliar o dano à membrana causado às células pelo processo de liofilização (tempo 0) e pelos possíveis aumentos de danos ocasionados durante o armazenamento (tempo 120). As células liofilizadas de cada cepa foram reidratadas (0,1 g/100 mL) em 5 mL de solução de fosfato tamponada (PBS; 8,0 g/L NaCl, 0,20 g/L KCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄, 0,24 g/L KH₂PO₄, pH 7,4), centrifugadas ($4500 \times g$, 10 min., 4 °C), lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS. Aliquotas de 200 µL de cada suspensão foram incubadas com PI (1 µg/mL) por 15 min. a 37 °C na ausência de luz (RAYMOND; CHAMPAGNE, 2015). Após o tempo de coloração, as células foram novamente centrifugadas ($4500 \times g$ for 10 min., 4 °C), lavadas com PBS para remover o excesso de corante e resuspensas em PBS (KIM; KIM; KANG, 2017). A análise de CF foi realizada usando um citômetro de fluxo equipado com um laser de íons de argônio com 488 nm de excitação (BD Accuri C6, New Jersey, USA). Sinais de dispersão e fluorescência de células individuais passando pela zona do laser foram coletados como sinais logarítmicos. O canal FL3 (>670 nm) foi usado para definir a fluorescência vermelha do PI. Os níveis limites para aquisição dos dados foi estabelecido por FSC (15.000) para eliminar sinais de detritos considerados muito menores que as células de *Lactobacillus*. Além disso, as células foram limitadas por parâmetros FSC/SSC. Cada aquisição de amostra foi operada em baixa taxa de fluxo com um total de 10.000 eventos adquiridos. Todos os citogramas foram gerados e analisados usando o software BD Accuri C6 (BD®, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

3.7 ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DAS CÉLULAS DE *LACTOBACILLUS* PROBIÓTICOS LIOFILIZADAS

Os aspectos ultra-estruturais das células de *L. plantarum* 201 liofilizado com YβG ou SS foram avaliados usando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Essa cepa foi selecionada para a análise de MEV considerando os resultados de viabilidade obtidos durante o armazenamento refrigerado. As amostras foram pré-fixadas com gluteraldeído (2 mL/100 mL) por 2 h a 4 °C, pós-fixadas com 1 g/100 mL de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) por 30 min. e aderidas a lamínulas revestidas com poli-lisina (CASARIN et al., 2016). As amostras foram desidratadas em etanol, secas até o ponto crítico com CO₂, revestidas com uma camada de ouro, 20 nm de espessura, e observadas em microscópio eletrônico de varredura EO 1430 VP (CARL ZEISS, Oberkochen, Germany).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios de contagem de células viáveis foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (repetições), sendo os resultados expressos como médias dos ensaios $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ou o teste t de Student. Para isto, foi utilizado o programa estatístico Sigma Stat 3.5 (JandelScientific Software, Califórnia).

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. M. R. et al. In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts as potential probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 4, p. 704-716, 2017.
- AHRÉN, I. L. et al. Antihypertensive activity of blueberries fermented by *Lactobacillus plantarum* DSM 15313 and effects on the gut microbiota in healthy rats. **Clinical Nutrition**, v. 34, p. 719-726, 2015.
- AMPATZOGLOU, A. et al. Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 1, p. 65-70, 2010.
- ARAÚJO, V. B. S. et al. Oral intake of carboxymethyl-glucan (CM-G) from yeast (*Saccharomyces uvarum*) reduces malondialdehyde levels in healthy men. **Molecules**, v. 20, p. 14950-14958, 2015.
- ARAÚJO, V. B. S. et al. Followed extraction of β -glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (*Saccharomyces uvarum*) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 23, p. 164-170, 2014.
- ASCHENBRENNER, M. et al. The contribution of the inherent restricted mobility of glassy sugar matrices to the overall stability of freeze-dried bacteria determined by low-resolution solid-state ^1H -NMR. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 1012–1024, 2014.
- BAGAD, M. et al. Survivability of freeze-dried probiotic *Pediococcus pentosaceus* strains GS4, GS17 and *Lactobacillus gasseri* (ATCC 19992) during storage with commonly used pharmaceutical excipients within a period of 120 days. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 10, p. 921-929, 2017.
- BAI, J. et al. Physiological functionalities and mechanisms of β -glucans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 57-66, 2019.
- BAKR, S. A. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 423-431, 2015.
- BALDASSANO, S.; ACCARDI, G.; VASTO, S. Beta-glucans and cancer: The influence of inflammation and gut peptide. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 486-492, 2017.
- BARBOSA, J. et al. Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 340-351, 2015.

BASHOLLI-SALIHU, M. et al. Effect of lyoprotectants on β -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. **LWT-Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 276-282, 2014.

BENSCH, G. et al. Flow cytometric viability assessment of lactic acid bacteria starter culture produced by fluidized bed drying. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4897–4909, 2014.

BEZERRA, L. S. et al. Modulation of vascular function and anti-aggregation effect induced by (1-3) (1-6)- β -D-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and its carboxymethylated derivative in rats. **Pharmacological Reports**, v. 69, p. 448–455, 2017.

BLAIOTTA, G. et al. Effect of chestnut extract and chestnut fiber on viability of potential probiotic *Lactobacillus* strains under gastrointestinal tract conditions. **Food Microbiology**, v. 36, p. 161-169, 2013.

BORA, A. F. M. et al. Improved viability of microencapsulated probiotics in a freeze-dried banana powder during storage and under simulated gastrointestinal tract. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. x, p. x-x, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9464-1>.

BORCHANI, C. et al. Enzymatic process for the fractionation of baker's yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*). **Food Chemistry**, v. 163, p. 108–113, 2014

BORCHANI, C. et al. Physical, functional and structural characterization of the cell wall fractions from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 194, p.1149–1155, 2016.

BRAVO-FERRADA, B. M. et al. Effect of protective agents and previous acclimation on ethanol resistance of frozen and freeze-dried *Lactobacillus plantarum* strains. **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 522-528, 2015.

BRIZUELA, N. et al. *Lactobacillus plantarum* as a malolactic starter culture in winemaking: a new (old) player?. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 38, p. 10-18, 2019.

BROECKX, G. et al. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, n. 1-2, p. 303-318, 2016.

CAO, L. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of probiotic powder containing *Lactobacillus plantarum* 1.2567 in necrotic enteritis model of broiler chickens. **Livestock Science**, v. 223, p. 157–163, 2019.

CASARIN, L. S. et al. Influence of free energy on the attachment of *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* on stainless steels AISI 304 and AISI 316. **Food Science and Technology**, v. 69, p. 131-138, 2016.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 185-193, 2011

CHARNCHAI, P. et al. Effects of the food manufacturing chain on the viability and functionality of *Bifidobacterium animalis* through simulated gastrointestinal conditions. **Plos One**, v. xx, p. xx-xx, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0157958.

CHEN, L. et al. Antiobesity effect of *Lactobacillus reuteri* 263 associated with energy metabolism remodeling of white adipose tissue in high-energy-diet-fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 54, p. 87–94, 2018.

CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated β -(1→3)-D-glucan from *Poria cocos*. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 4, p. 398-405, 2010.

CHIU, Y. H. et al. *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench polysaccharide enhances the resistance of *Bifidobacterium longum* MYL16 to freeze-drying and artificially digestive processes. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 172-177, 2014.

CHOTIKO, A.; SATHIVEL, S. Effects of enzymatically-extracted purple rice bran fiber as a protectant of *L. plantarum* NRRL B-4496 during freezing, freeze drying, and storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 59-64, 2014.

COSTA, W. K. A. et al. Qualification of tropical fruit-derived *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotics acting on blood glucose and total cholesterol levels in Wistar rats. **Food Research International**, v. x, p. x–x, 2018a.

COSTA, W. K. A. et al. Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. **Food Research International**, v. 108, p. 172-182, 2018b.

CUI, S. et al. Effect of acids produced from carbohydrate metabolism in cryoprotectants on the viability of freeze-dried *Lactobacillus* and prediction of optimal initial cell concentration. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 5, p. 513-518, 2017.

DAS, K.; CHOUDHARY, R.; THOMPSON-WITRICKB, K. A. Effects of new technology on the current manufacturing process of yogurt-to increase the overall marketability of yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 108, p. 69–80, 2019.

DÍAZ, M. et al. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 385-407, 2010.

DIETRICH-MUSZALSKA, et al. Beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces plasma lipid peroxidation induced by haloperidol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, p. 113-116, 2011.

DIMITRELLOU, D.; KANDYLIS, P.; KOURKOUTAS, Y. Effect of cooling rate, freeze-drying, and storage on survival of free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 468-473, 2016.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v. 15, n. 2, p. 219-232, 2008.

DODOO, C. C. et al. Targeted delivery of probiotics to enhance gastrointestinal stability and intestinal colonisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 530, n. 1-2, p. 224-229, 2017.

DU, B.; BIAN, Z.; XU, B. Skin health promotion effects of natural beta-glucan derived from cereals and microorganisms: a review. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 2, p. 159-166, 2014.

EL ENSHASY, H. A.; HATTI-KAUL, R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. **Trends in biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 668-77, 2013.

EJTAHED, H. S. et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 539-543, 2012.

FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of United States/World Health Organization. **Probiotics in food, health and nutritional properties and guideline for evaluation**. Rome: FAO Food and Nutritional Paper, 2006.

FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of United States/World Health Organization. **Guidelines for evaluation of probiotics in food** London. Ontario, Canada, 2002.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 77-84, 2010

FESEL, P. H.; ZUCCARO, A. β -glucan: crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 90, p. 53–60, 2016.

FRAU, F. et al. Development of an autochthonous starter culture for spreadable goat cheese. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 4, p. 622-630, 2016.

FULLER, R. et al. Yeast-derived β -1,3/1,6 glucan, upper respiratory tract infection and innate immunity in older adults. **Nutrition**, v. 39-40, p. 30–35, 2017.

GANI, A. et al. β -D-glucan as an enteric delivery vehicle for probiotics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 864–869, 2018.

GARCIA, E. F. et al. The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 13, p. 5000-5010, 2018.

GARCIA, E. F. et al. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers Microbiol**, v. 7, p. 1–11, 2016.

GARVEY, C. J. et al. Phospholipid membrane protection by sugar molecules during dehydration-insights into molecular mechanisms using scattering techniques. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 8148–8163, 2013.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILLI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 6, p. 1-8, 2010.

GRASMEIJER, N. et al. Unraveling protein stabilization mechanisms: vitrification and water replacement in a glass transition temperature controlled system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1834, p. 763–769, 2013.

GRAUBAUM, H. J. et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled nutritional study using an insoluble yeast beta-glucan to improve the immune defense system. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 738-746, 2012.

GUERGOLETTI, K. B. et al. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 415-421, 2010.

GULLÓN, B. et al. Structural features and assessment of prebiotic activity of refined arabinoxyloligosaccharides from wheat bran. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 438-449, 2014.

HAN, F. et al. Oral administration of yeast β -glucan ameliorates inflammation and intestinal barrier in dextran sodium sulfate-induced acute colitis. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 115-126, 2017.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121–129, 2001.

HEYDARI, Z.; RAHAIE, M.; ALIZADEH, A. M. Different anti-inflammatory effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in hepatocellular carcinoma cancer mouse through impact on micro RNAs and their target genes. **Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism**, v. 16, p. 100096, 2019.

HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, p. 506–514, 2014.

HOWARTH, G. S.; WANG, H. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. **Nutrients**, v. 5, n. 1, p. 58-81, 2013.

IACONELLI, C. et al. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. **Journal of Biotechnology**, v. 214, p. 17–26, 2015.

ISHIMOTO, Y. et al. Modulation of an innate immune response by soluble yeast β -glucan prepared by a heat degradation method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 367–376, 2017.

JIN, Y.; LI, P.; WANG, F. β -glucans as potential immuno adjuvants: a review on the adjuvanticity, structure activity relationship and receptor recognition properties. **Vaccine**, v. 36, p. 5235–5244, 2018

KHAN, A. A. et al. Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of β -D-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)-Effect of γ -irradiation. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 442–450, 2016.

KIM, D. K.; KIM, S. J.; KANG, D. H. Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. **Food Research International**, v. 97, p. 280-287, 2017.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, n. 23, p. 1-14, 2013.

KONAR, N. et al. Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 43, p. 206–213, 2018.

KONAR, N. et al. functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 35-44, 2016.

LIAO, N. et al. Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 2, p. 263-272, 2019.

LOLLO, P. C. B. et al. Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3549–3558, 2012.

LUCIANO, W. A. et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* LA-3 on physicochemical and sensory parameters of açai and mango based smoothies and its survival following simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 114, p. 159–168, 2018.

MAGNANI, M. et al. Optimized methodology for extraction of (1→3)(1→6)-β-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 658–665, 2009.

MAGNANI, M. et al. Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 1, p. 859-862, 2010.

MAGNANI, M. et al. Protective effect of carboxymethyl-glucan (CM-G) against DNA damage in patients with advanced prostate cancer. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.1, p.131-134, 2011.

MANTZOURANI, I. et al. Effect of a novel *Lactobacillus paracasei* starter on sourdough bread quality. **Food Chemistry**, v. 271, p. 259–265, 2019.

MARTINEZ, R. C.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 12, p. 1993-2015, 2015.

MARTINS, I. B. A. et al. Viability of probiotics in goat cheese during storage and under simulated gastrointestinal conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 853–863, 2018.

MENSINK, M. A. et al. In-line near infrared spectroscopy during freeze-drying as a tool to measure efficiency of hydrogen bond formation between protein and sugar, predictive of protein storage stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 496, p. 792–800, 2015.

MENSINK, M. A. et al. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 114, p. 288–295, 2017.

MIHAILOVIC, M. et al. Oral administration of probiotic *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 attenuates diabetes-induced liver and kidney damage in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 427–437, 2017.

MO, L. et al. Anti-tumor effects of (1→3)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* in S180 tumor-bearing mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 385–392, 2017.

MOUMITA, S. et al. Effect of long-term storage on viability and acceptability of lyophilized and spray-dried synbiotic microcapsules in dry functional food formulations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 127–132, 2018.

MOURA, C. S. et al. Assessment of antioxidant activity, lipid profile, general biochemical and immune system responses of Wistar rats fed with dairy dessert containing *Lactobacillus acidophilus* La-5. **Food Research International**, v. 90, p. 275–280, 2016.

MUÑOZ, N. et al. Use of protective culture to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in ready-to-eat cook-chill products. **Food Control**, v. 102, p. 81–86, 2019.

NAHR, F. K. et al. Optimization of the nanocellulose based cryoprotective medium to enhance the viability of freeze dried *Lactobacillus plantarum* using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 326–332, 2015.

NAJARIAN, A.; SHARIF, S.; GRIFFITHSM, M. W. Evaluation of protective effect of *Lactobacillus acidophilus* La-5 on toxicity and colonization of *Clostridium difficile* in human epithelial cells *in vitro*. **Anaerobe**, v. 55, p. 142–151, 2019.

NINGTYAS, D. W. et al. The viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (non-encapsulated and encapsulated) in functional reduced-fat cream cheese and its textural properties during storage. **Food Control**, v. 100, p. 8–16, 2019.

NOVAK, M.; VETVICKA, V. Glucans as biological response modifiers. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets**, v. 9, p. 67–75, 2009.

PASSOT, S. et al. Critical water activity and amorphous state for optimal preservation of lyophilised lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1699–1705, 2012.

PIMENTEL, T. C. et al. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 415–422, 2015.

PINTO, M. et al. Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: a structural characterization approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 215–222, 2015.

PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, R. K. Probiotic potential of lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: an in vitro validation for the production of inhibitory substances. **Biomedical Journal**, v. 40, p. 270-283, 2017.

QUINTANA, G. L.; GERBINO, E.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Okara: a nutritionally valuable by-product able to stabilize *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, spray-drying, and storage. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 641, 2017.

RAYMOND, Y.; CHAMPAGNE, C. P. The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. **Food Microbiology**, v. 46, p. 176-183, 2015.

ROMANO, N. et al. Role of mono-and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Food Research International**, v. 90, p. 251-258, 2016a.

ROMANO, N. et al. Prebiotics as Protectants of Lactic Acid Bacteria. **Research Gate**, v. 10, p. 1-13, 2016b.

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

SANTOS, D. X. et al. Improved probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in a mousse containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulated with inulin by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 404–410, 2019.

SANTOS, M. I. et al. Stability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in the presence of galacto-oligosaccharides and lactulose as determined by near infrared spectroscopy. **Food Research International**, v. 59, p. 53–60, 2014.

SAUER, M. et al. The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 756-769. 2017.

SAVARD, P. et al. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 50-57, 2011.

SHAO, Y. et al. Influence of culture conditions and preconditioning on survival of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* ND02 during lyophilization. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 3, p. 1270-1280, 2014.

SHU, G. et al. Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 70–76, 2018.

SRISUKCHAYAKUL, P.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KARATZAS, K. A. Study on the effect of citric acid adaptation toward the subsequent survival of *Lactobacillus plantarum*

NCIMB 8826 in low pH fruit juices during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 111, p. 198–204, 2018.

STEPHAN, D.; DA SILVA, A. P. M.; BISUTTI, I. L. Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas spp.* and its influence on viability, storability and efficacy. **Biological Control**, v. 94, p. 74–81, 2016.

STEWART, G. G. *Saccharomyces* species in the production of beer. **Beverages**, v. 2, n. 34, p. 1–18, 2016.

STOYANOVA, L. G.; USTYUGOVA, E. A.; NETRUSOV, A. I. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 229–243, 2012.

TANG, Q. et al. The antioxidant activities of six (1→3)- β -D-glucan derivatives prepared from yeast cell wall. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 216–221, 2017.

TORRES, D. P. M. et al. Water sorption and plasticization of an amorphous galacto-oligosaccharide mixture. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 831–835, 2011.

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

TYMCZYSZYN, E. E. et al. Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, p. 217–221, 2012.

VARELAS, V. et al. Valorization of winery spent yeast waste biomass as a new source for the production of β -glucan. **Waste Biomass Valor**, v.7, p. 807–817, 2016.

VIJAYA KUMAR, B.; VIJAYENDRA, S. V. N.; REDDY, O. V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6112–6124, 2015.

WATANABE, N.; SUGA, K.; UMAKOSHI, H. Functional hydration behavior: interrelation between hydration and molecular properties at lipid membrane interfaces. **Journal of Chemistry**, v. 2019, p. 15, 2019.

WANG, Q. et al. β -glucans: relationships between modification, conformation and functional activities. **Molecules**, v. 22, n. 257, 2017.

WENG, L.; ZIAEI, S.; ELLIOTT, G. D. Effects of water on structure and dynamics of trehalose glasses at low water contents and its relationship to preservation outcomes. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

XU, X.; YASUDA, M.; MIZUNO, M.; ASHIDA, H. β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 1656–1663, 2012.

XU, Y. et al. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria: structures, physiochemical functions and applications in the food industry. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 475–499, 2019.

ZHANG, H. et al. Prospective study of probiotic supplementation results in immune stimulation and improvement of upper respiratory infection rate. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 3, p. 113-120, 2018.

ZHENG, P. et al. *Lactobacillus pentosus* strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, p. 168-174, 2016.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of betaglucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 275-288, 2016.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO

PROTECTIVE EFFECTS OF β -GLUCAN EXTRACTED FROM SPENT BREWER YEAST DURING FREEZE-DRYING, STORAGE AND EXPOSURE TO SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITION OF PROBIOTIC LACTOBACILLI

Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal condition of probiotic lactobacilli

Jéssica da Silva Guedes^a, Tatiana Colombo Pimentel^b, Helena Tainá Diniz-Silva^a, Erika Tayse da Cruz Almeida^c, Josean Fachine Tavares^d, Evandro Leite de Souza^c, Estefânia Fernandes Garcia^a, Marciane Magnani^a

^a *Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

^b *Federal Institute of Paraná, Campus Paranavaí, Paranavaí, Brazil*

^c *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Federal University of Paraíba, Brazil*

^d *Nucleus for Characterization and Analysis, Department of Pharmaceutical Sciences, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil*

Abstract

This study aimed to evaluate the potential of spent brewer's yeast β -glucans (Y β G) as a protective agent of three probiotic *Lactobacillus* cultures (*L. acidophilus* LA-05, *L. plantarum* 49, and *L. plantarum* 201) during freeze drying, storage (4 °C/120 days) and *in vitro* digestion. The membrane integrity and the cell ultra-structure were also evaluated. An established cryoprotectant (Fructooligosaccharides, FOS) was used for comparison. β -glucan acted as a cryoprotectant for probiotic lactobacilli during freeze-drying, refrigerated storage (90 days) and simulated gastrointestinal conditions (SGIC), in a similar manner to that of FOS. However, after that, FOS provided a higher protection and resulted in cells with lower membrane damage. The effect of the cryoprotectants and the resistance to the SGIC varied with the strain tested. Y β G performed better as cryoprotectant toward *L. plantarum* 201. The

micrographs showed that *L. plantarum* 201 could adhere to Y β G surface and produce exopolysaccharides. This study demonstrated that a β -glucan extracted from spent brewer yeast could be used as a cryoprotectant for probiotic lactobacilli during freeze-drying, refrigerated storage and exposure to SGIC.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, cryoprotectant, fructooligosaccharides, glucan.

1 Introduction

Probiotics are living microorganisms that when consumed in adequate amounts confer benefits to the host health (Hill et al., 2014). For the successfully incorporation of probiotic cultures in foods, it is necessary to maintain the viability and integrity of cells, allowing them to reach the intestine insufficient viable cells number and with enough physiological capacity to exert effects on the host (Tripathi & Giri, 2014; Barbosa et al., 2015).

Lactobacillus genus includes most of the probiotic strains intensively studied for incorporation in foods, because of their widely recognized health benefits (Ningtyas, Bhandari, Bansal & Prakash, 2019). The primary challenge for the development of probiotic foods is to maintain the survival of the probiotic cultures during the manufacture and storage of the product (Tripathi & Giri, 2014). Generally, probiotic cultures for food applications are supplied as freeze-dried powders because the freeze-drying process make possible the removal of water from cells without using high temperatures (Iaconeli et al., 2015). Freeze-drying allows the stability of probiotics for prolonged storage time; however, the cell dehydration may cause structural damage, resulting in loss of cell viability during storage (Tymcyszyn et al., 2012). One strategy to avoid the viability loss in freeze-dried probiotic cultures is the use of substances capable of protecting the cells from membrane injury, which are named as cryoprotectants (Romano, Schebor, Mobili, & Gómez-Zavaglia, 2016).

Various substances have been proposed as cryoprotectants agents of probiotic cultures, such as sorbitol, ascorbic acid and skim milk (Bagad, Pande, Dubey & Ghosh, 2017), mono and disaccharides (sucrose, lactose, fructose and trehalose, Basholli-Salih, Mueller, Salar-Behzadi, Unger & Viernstein, 2014), and prebiotic substances, such as fructo-oligosaccharides (FOS, Romano et al., 2016), and galacto-oligosaccharides (GOS, Tymczyszyn et al., 2012). The carbohydrates polymers have been considered the best protectants because they allow the cells to be accommodated between the spaces and surface of their molecular arrangement, as well as due to their capacity to form a glassy state of low molecular interaction (Chiu, Ou, Fu, & Lin, 2014). Recent studies reported FOS as one of the most efficient probiotic protectants (Bora, Li, Zhu, & Du, 2018; Liao et al., 2019).

β -glucans are glucose homopolymers constituents of yeast cell wall and well-known by their bioactivity, which is related to the structure of the polymer and the method employed for their extraction (Magnani et al., 2009). An important source of β -glucans is *Saccharomyces uvarum*, the major biotechnological tool to produce low fermentation beer (Araújo et al., 2014). After four or five fermentative processes for beer production, the brewer cell yeasts are discarded and generally used for animal feed (Ferreira, Pinho, Vieira, & Tavela, 2010). In previous studies we developed an alternative method to isolate β -glucan from *Saccharomyces* cell wall using sonication and enzymatic treatments (Magnani et al., 2009; Araújo et al., 2014). β -glucan obtained by this method revealed lack of toxicity (Magnani et al., 2009) and immunostimulatory and antioxidant effects in humans after daily consumption (Magnani et al., 2010; Araújo et al., 2015). In addition, it could modulate vascular function and had anti-aggregation activity (Bezerra et al., 2017). However, despite these reports, the potential of brewer spent yeast glucans as cell cryoprotectants remains unknown.

This study was performed to evaluate the potential of spent brewer yeast β -glucans as a protective agent of three probiotic *Lactobacillus* cultures during freeze drying, refrigerated storage and *in vitro* digestion. The damage in probiotic cell membrane as well as the cell ultra-structure were evaluated.

2 Materials and Methods

2.1 Spent brewer's yeast β -glucan

The β -glucan was isolated from the cell wall of brewer yeast (*Saccharomyces uvarum*) discarded after five fermentative processes as brewery slurry using sonication and enzymatic treatments (Magnani et al., 2009). The identity of the polymer was confirmed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The ^{13}C and ^1H NMR spectra were obtained dissolving 50 mg of the β -glucan in deuterated dimethyl sulfoxide (d6-DMSO) by 500 MHz Varian NMR spectrometer, operating at 125 MHz for ^{13}C and 500 MHz for ^1H . The chemical shifts were expressed in ppm.

2.2 Probiotic lactobacilli strains

Lactobacillus acidophilus LA-05, a commercial probiotic strain (Chr. Hansen SA, Valinhos, São Paulo), and *L. plantarum* 49 and *L. plantarum* 201, probiotic fruit-derived lactobacilli (da Costa et al., 2018) were used. Stock cultures were maintained in cryovials at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol (20 mL/100 mL, Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

2.3 Freeze drying procedure

Each *Lactobacillus* strain was inoculated in MRS broth and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h under anaerobic conditions (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) to obtain the pre-

inoculum. Subsequently, the pre-inoculum (10 mL/100 mL) was added to MRS broth and incubated anaerobically at 37 °C overnight. Cells were harvested by centrifugation ($4000 \times g$, 10 min, 4 °C), washed twice and re-suspended in sterile saline solution (0.85 g/100 mL) to obtain standard cell suspensions. Optical Density (OD) reading at 660 nm (OD_{660}) was 1.2 to provide viable cell counts of approximately $9 \log$ CFU/mL (Garcia et al., 2018). The yeast β -glucan (Y β G; 10 g/100 mL) or fructo-oligosaccharides (FOS; 10g/100 mL) (Romano et al., 2016), were mixed with cells suspensions as a positive control, while saline solution (SS; 0.85 g/100 mL NaCl) was used as a negative control. The suspensions were maintained at room temperature for 1 h (Guergoletto, Magnani, Martin, Andrade, & Garcia, 2010) and, subsequently, fractionated in aliquots of 1 mL, aseptically transferred into 5 mL vials and frozen at -20 °C for 24 h. The freeze-drying process lasted 40 h (Garcia et al., 2018) and was carried out at -55 ± 2 °C; vacuum pressure $<138 \mu\text{Hg}$ in a freeze-drying speed 1 mm/h using a bench-top lyophiliser (model L-101, Liotop, São Carlos, Brazil). After freeze-drying, the vials were closed and packed in metalized Biaxially Oriented Polypropylene (BOPP) bags, hermetically sealed and stored under refrigeration (4 ± 0.5 °C).

2.4 Viable cell counts and water activity

Viable cells of freeze-dried probiotic cultures were enumerated at 0 (immediately after freeze drying), 7, 15, 30, 60, 90 and 120 days. For that, freeze-dried cells were initially rehydrated in sterile peptone water (0.1 g/100 mL) at room temperature for 15 min (Santos, Gerbino, Araujo-Andrade, Tymczyszyn, & Gómez-Zavaglia, 2014). Then, a 100 μL -aliquot was serially diluted in sterile saline solution (10^{-1} - 10^{-7}), plated on MRS agar using a microdrop inoculation technique (Herigstad, Hamilton & Heersink, 2001), incubated at 37 °C for 48 h under anaerobic conditions and viable cells were enumerated. The reduction of viable counts was obtained using $\log N/N_0$, where N is the viable count (CFU/mL) at each storage

time, and N_0 is the viable count (CFU/mL) immediately after the freeze-drying (Barbosa et al., 2015). The detection limit was 2 log CFU/mL. The water activity (a_w) was measured in the same time intervals using an a_w instrument (Alemmar, Model Labmaster- a_w , BRA) at $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.5 Viable counts of freeze-dried probiotic lactobacilli cells during in vitro digestion

Freeze-dried probiotic cultures were exposed to the simulated gastrointestinal conditions (SGIC) immediately after freeze-drying and after 60 and 120 days of storage according to de Albuquerque et al. (2017), with modifications. The experiments were performed in an incubator at 37°C with mechanical agitation. Before assay, freeze-dried probiotic cultures were reconstituted in 25 mL of MRS broth for 15 min (Champagne, Ross, Saarela, Hansen, & Charalampopoulos, 2011). The esophagus-stomach was simulated using 25 mg of pepsin diluted in 1 mL of 0.1 mM/L HCl, added at a rate of 0.05 mL/mL, with gradual decrease of pH using 1 mM/L HCl (pH 5.5/10 min; pH 4.6/10 min; pH 3.8/10 min; pH 2.8/20 min; pH 2.3/20 min and pH 2.0/ 20 min) under stirring (130 rpm). Duodenal conditions were simulated with 2 g pancreatin/L of 0.1 mM/L NaHCO_3 and 12 g bovine bile salts/L of 0.1 mM/L NaHCO_3 , pH adjusted for 5.0 with 0.1 mM/L NaHCO_3 and exposure time of 30 min under stirring (45 rpm); and ileal conditions with pH adjusted to 6.5 using 0.1 mM/L NaHCO_3 , exposure time of 60 min under stirring (45 rpm). The enzymes and bile salts were from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). After each simulation phase, 100 μL -aliquots of each lactobacilli strain were serially diluted, plated on MRS agar and incubated for 48 h at 37°C under anaerobic conditions. The reduction of viable counts was obtained using $\log N/N_0$, where N is the viable count (CFU/mL) in each digestive step, and N_0 is the viable count (CFU/mL) before the digestion. The detection limit was 2 log CFU/mL.

2.6 Measurements of membrane damage of freeze-dried probiotic lactobacilli cells

The freeze-dried probiotic cultures were stained using propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and analyzed by flow cytometry (FC) just after the freeze-drying process and after 120 days of storage. The freeze-dried cells were rehydrated (0.1 g/100 mL) in 5 mL of phosphate buffered saline (PBS; 8.0 g/L NaCl, 0.20 g/L KCl, 1.44 g/L Na₂HPO₄, 0.24 g/L KH₂PO₄, pH 7.4), harvested (4500 × g, 10 min, 4 °C), washed twice and re-suspended in PBS. Aliquots of 200 µL of each suspension were incubated with the probe PI (1 µg/mL) for 15 min at 37 °C in a dark room (Raymond & Champagne, 2015). After the staining time, cells were centrifuged (4500 × g for 10 min, 4 °C), washed with PBS to remove the dye excess and resuspended in PBS (Kim et al., 2017). FC analyses were performed using a flow cytometer equipped with an argon-ion laser with 488-nm excitation (BD Accuri C6, New Jersey, USA). Scatter and fluorescence signals of individual cells passing through the laser zone were collected as logarithmic signals. FL3 channel (>670 nm) was used to set the red fluorescence of PI. Thresholds level for data acquisition was set on for FSC (15,000) to eliminate background and signals from debris considered much smaller than lactobacilli cells. Besides that, the cells were gated per FSC/SSC parameters. Each sample acquisition was operated at the low flow rate setting with a total of 10,000 events acquired. All cytograms were built and analyzed using BD Accuri C6 Software (BD®, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.7 Ultrastructural aspects of freeze-dried probiotic *Lactobacillus* cells

The ultrastructural aspects of freeze-dried cells of *L. plantarum* 201 freeze-dried with YβG or SS were assessed using scanning electron microscopy (SEM), selected considering the results of viable counts during refrigerated storage. Samples were pre-fixed with glutaraldehyde (2 mL/100 mL) for 2 h at 4 °C, post-fixed with 1 g/100 mL osmium tetroxide

in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 30 min and allowed to adhere to poly-lysine-coated coverslips (Casarin et al., 2016). The samples were dehydrated in ethanol, critical-point-dried with CO₂, coated with a 20-nm-thick gold layer and observed using a scanning electron microscope EO 1430 VP (CARL ZEISS, Oberkochen, Germany).

2.9 Statistical analysis

The viable count assays were performed in triplicate in three independent experiments. Statistical analysis was performed to determine significant differences ($p < 0.05$) using Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey test or Student t-test and the software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, California).

3. Results and discussion

3.1 Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

The ¹³C NMR spectrum of the β-glucan showed six major carbon signals, which were assigned to 105.7 ppm (C1), 75.5 ppm (C2), 88.8 ppm (C3), 71.0 ppm (C4), 79.0 ppm (C5) and 63.5 ppm (C6) (Supplementary Figure 1). The peak identified at 105.7 ppm in C1 corresponds to the β anomeric carbons, revealing that the polysaccharide contains homogeneous monosaccharide units (Dong, Yao, Yang, & Fanga, 2002). The chemical shift around 88.8 ppm indicated that the glycosidic units are linked by β-D-(1→3) in the YβG main chain (Tang et al., 2017). Furthermore, the O-6 substitution, confirmed by the signals around 71 ppm, refers to side-glycosidic units linked with C3 in 1→6 (Ruthes et al., 2013). In the ¹H NMR spectrum, chemical shifts around 4.5 ppm were observed.

3.2 Viable cell counts after freeze-drying and during storage

A reduction ($p < 0.05$) of approximately 1 log cycle was observed in viable counts of all tested probiotic strains just after freeze-drying (Table 1). Freeze-drying is one of the main processes used to obtain dry probiotic products, since it is possible to avoid thermal damage and oxidative stress in cells. However, this technique is followed by decreases in probiotic survival after its application and subsequent storage (Chiu et al., 2014). For this reason, the use of cryoprotectants is an alternative to decrease cell damages and viability loss.

Y β G and FOS proved to be good cryoprotectants during the storage of the freeze-died probiotic cultures (120 days), with lower reductions (1-3 log cycles) compared to the saline solution (SS, 4 log cycles) ($p < 0.05$, Fig. 1A-C). The effect of Y β G and FOS during refrigerated storage was dependent on the probiotic strain. Both cryoprotectants had similar effects on *L. acidophilus* LA-05 during the entire shelf life ($p \geq 0.05$). For *L. plantarum* 49 and *L. plantarum* 201, Y β G and FOS provided similar protection up to 90 days of storage ($p \geq 0.05$). After that, FOS provided higher protection on *L. plantarum* 49, and Y β G provided higher protection on *L. plantarum* 201 ($p < 0.05$). The highest protective effect was exerted by Y β G toward *L. plantarum* 201, presenting the lowest reduction in viable counts during storage (1.2 log CFU/mL after 120 days, Fig. 1C).

Carbohydrates have different mechanisms to protect the probiotic cells from damages caused by freeze-drying and storage. They can form a glassy structure characterized by a high viscosity and low molecular interactions called state of vitrification (Tymczyszyn et al., 2012). Furthermore, they can reduce the mechanical damage and osmotic stress in cells since their presence increases the unfrozen portion on the freezing media (Shu, Wang, Chen, Wan, & Chen, 2018). The effect of FOS as a protectant of probiotic bacteria is strongly influenced by its composition and chain length, which can support the protection of the lipid membranes or the formation of vitreous states (Romano et al., 2016). The protection provided by the Y β G during freeze-drying and storage could be associated to the presence of several hydroxyl

groups in its structure, that can replace the sites previously occupied by water before freeze-drying, and by the stabilization of membranes, maintaining the biological structures in a similar state to those in hydrated conditions (Romano et al., 2016). A physical protection to probiotic cultures through the attachment of cells inside the fiber matrix could also be an explanation (Chotiko & Shativel, 2014).

The effect of a cryoprotectant is influenced by storage conditions, such as temperature, relative humidity and water content of the freeze-dried bacteria (Santos et al., 2014). Values of a_w of 0.346-0.378 were observed in freeze-dried lactobacilli cultures, with no changes during the storage period ($p \geq 0.05$), revealing the stability of freeze-dried powder obtained with Y β G, FOS or SS.

3.3 Viable counts of freeze-dried probiotic cells during SGIC

Y β G and FOS proved to be good cryoprotectants during the SGIC of the freeze-dried probiotic cultures, as the control strains (SS) showed higher decrease in viable counts during *in vitro* digestion (up to 2 log cycles) than those freeze-dried with Y β G and FOS (0-1 log cycles, Fig. 2 A-I) in almost every storage time. After 120 days of storage and exposure to SGIC, probiotic counts of 5.02-6.74 log CFU/mL were observed in the presence of with Y β G and FOS, while in SS it was 3.7-3.8 log CFU/mL. These results suggest that the damage caused by freeze-drying and storage turn the cells susceptible to the low pH and digestive enzymes not allowing the complete recovery of the cells, but this impact was reduced in the presence of the prebiotic components. In fact, the presence of prebiotics during growth of *Lactobacillus* strains can increase the bacterial resistance to gastrointestinal conditions (Hernandez-Hernandez et al., 2012).

The protective effect of the cryoprotectants (Y β G and FOS) was dependent on the probiotic strain. For *L. acidophilus* LA-05 and *L. plantarum* 201, both Y β G and FOS

provided similar protective effects ($p \geq 0.05$), while for *L. plantarum* 49, FOS provided higher protective effects ($p < 0.05$). Furthermore, the resistance of the probiotic cultures to the SGIC was dependent on the strain used. Freeze-dried *L. plantarum* 49 and *L. plantarum* 201 showed lower reductions in viable counts than *L. acidophilus* LA-05 during SGIC just after freeze-drying (Fig 2A, 2B, 2C). Since *L. plantarum* 49 and *L. plantarum* 201 were isolated from acidic fruits and their byproducts, these strains were adapted to environments with low pH, having a higher tolerance to the acidic conditions presented at the stomach stage (da Costa et al., 2018).

The impact of the storage period on the resistance of the probiotic cultures to the SIGC was observed, as a decrease in viable counts occurred in early stages of digestion for the stored lactobacilli cells compared to the recently freeze-dried cells ($p < 0.05$, Fig. 2A-I). This could be explained by the fact that injuries in the cells, aggravated during storage time, can affect the permeability of plasma membrane, and, consequently, the regulation of intracellular pH and the response of bacteria cells to acid-stress conditions (Chotiko & Shativil, 2014).

3.4 Measurements of damage in membrane in freeze-dried cells

The assessment of membrane integrity is an important proof of cell viability, however without guarantee of cell growth. Cells with damaged or compromised membranes cannot keep or produce the electrochemical gradient and consequently the membrane potential (de Sousa Guedes et al., 2017). The effect of the cryoprotectants (Y β G and FOS) on the reduction of the membrane damage could be observed (Fig. 3 and 4). Just after freeze-drying, Y β G provided reductions of 52.2 -75.5% in the probiotic membrane damage compared to SS, while FOS provided reductions of 37.2- 83.5% (Fig. 3; $p < 0.05$). After 120 days of storage, Y β G provided reductions of 21- 65.8%, while FOS provided reductions of 56.8- 75.7% (Fig. 4; $p < 0.05$). Therefore, both cryoprotectants (FOS and Y β G) presented protective effects toward the

probiotic cells, which presented smaller subpopulation with membrane damage compared to cells freeze-dried with SS. This effect was more prominent for FOS than for Y β G. However, these results did not affect the viable counts of lactobacilli strains (Fig. 1 and 2), suggesting that bacteria cells can be recovered even when the cellular membrane is damaged. These injuries can increase the length of the lag time of bacteria growth (Tymczynszyn et al., 2012). Furthermore, higher subpopulations of cells with membrane damage were verified after 120 days rather than just after freeze-drying.

3.5 Ultrastructural aspects of freeze-dried cells

The micrographs showed that *L. plantarum* 201 can adhere to the Y β G surface (Fig. 5B) and produce EPS (details of Fig. 5B), which was observed among the bacterial cells and linked to the Y β G. *L. plantarum* 201 freeze-dried with SS did not produce EPS and presented bubbles in the cell surface, which are described in cell without membrane integrity and may be further associated with cell shrinkage and rupture (Alvez, Messaoud, Desobry, Costa, & Rodrigues, 2016). Therefore, probably, the adherence of the probiotic culture to the Y β G contributed to its protective effects during freeze-drying, storage and exposure to SGIC. However, the behavior and possible interactions between freeze-dried *Lactobacillus* strains and yeast β -glucan should be explored in further studies.

Conclusion

Y β G can be considered a cryoprotectant of probiotic lactobacilli (*L. acidophilus* LA-05, *L. plantarum* 49, and *L. plantarum* 201) during freeze-drying, storage and SGIC. The protective effects of Y β G on the probiotic cells were similar to that of FOS after freeze-drying as well as during storage for 90 days and when exposed to SGIC. However, after the 90 days of storage, FOS provided a higher protection and resulted in cells with lower damage. Y β G

offers advantages as a cryoprotectant with potential application as a functional food ingredient, because it can be obtained from a by-product of the beer industry, adding value and contributing to decrease negative environmental impacts. These findings suggest the utilization of Y β G as an alternative to protect freeze-dried lactobacilli during short- or medium-term storage. Particularly, its use is suggested for *L. plantarum* 201, in which higher protection effects could be observed.

Acknowledgments

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq-Brazil Grant Number 401100/2014-6) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES-Brazil Finance - Code 001) for the scholarship of J.S Guedes. To the Complex of Research Support Centers (COMCAP) of the State University of Maringá for the SEM analysis.

Reference

- Alvez, 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. *Journal of Food Engineering*, 189, 45-54.
- Araújo, V. B. S., de Melo, A. N. F., Costa, A. G., Castro-Gomez, R. H., Madruga, M. S., de Souza, E. L., & Magnani, M. (2014). Followed extraction of β -glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (*Saccharomyces uvarum*) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 23, 164-170.
- Araújo, V. B. S., de Melo, A. N. F., Souza, N. T., Silva, V. M. B., Castro-Gomez, R. H., Silva, A. S., Souza, E. L., & Magnani, M. (2015). Oral intake of carboxymethyl-glucan (CM-

G) from yeast (*Saccharomyces uvarum*) reduces malondialdehyde levels in healthy men. *Molecules*, 20, 14950-14958.

Bagad, M., Pande, R., Dubey, V., & Ghosh, A. R., (2017). Survivability of freeze-dried probiotic *Pediococcus pentosaceus* strains GS4, GS17 and *Lactobacillus gasseri* (ATCC 19992) during storage with commonly used pharmaceutical excipients within a period of 120 days. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 921–929.

Barbosa, J., Borges, S., Amorim, M., Pereira, M. J., Oliveira, A., Pintado, M. E., & Teixeira, P. (2015). Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *Journal of Functional Foods*, 17, 340–351.

Basholli-Salih, M., Mueller, M., Salar-Behzadi, S., Unger, F. M., & Viernstein, H. (2014). Effect of lyoprotectants on β -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 276-282.

Bezerra, L. S., Magnani, M., Castro-Gomez, R. J. H., Cavalcante, H. C., Silva, T. A. F., Vieira, R. L. P., Medeiros, I. A., & Verasa, R. C. (2017). Modulation of vascular function and anti-aggregation effect induced by (1 $\rightarrow$ 3) (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and its carboxymethylated derivative in rats. *Pharmacological Reports*, 69, 448–455.

Bora, A. F. M., Li, X., Zhu, Y., & Du, L. (2018). Improved viability of microencapsulated probiotics in a freeze-dried banana powder during storage and under simulated gastrointestinal tract. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-10
<https://doi.org/10.1007/s12602-018-9464-1>.

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. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 185-193.

- Chiu, Y.-H., Ou, C.C., Fu, H.-C., & Lin, M. Y. (2014). *Abelmoschus esculentus* (L.) moench polysaccharide enhances the resistance of *Bifidobacterium longum* MYL16 to freeze-drying and artificially digestive processes. *Journal of functional foods*, 11, 172-177.
- Chotiko, A., & Sathivel, S. (2014). Effects of enzymatically-extracted purple rice bran fiber as a protectant of *L. plantarum* NRRL B-4496 during freezing, freeze drying, and storage. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 59-64.
- da Costa, W. K. A., Brandão, L. R., Martino, M. A, Garcia, E. F., Alves, A. F., de Souza, E. L., Aquino, J. S., Saarela, M., Leulier, F., Vidal, H., & Magnani, M. (2018). Qualification of tropical fruit-derived *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotics acting on blood glucose and total cholesterol levels in Wistar rats. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.035>.
- de Albuquerque, T. M. R., Garcia, E. F., Araújo, A. O., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2017). In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts as potential probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(4), 704-716, <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>.
- de Sousa Guedes, J. P. S., Medeiros, J. A. C., Silva, R. S. S., Sousa, J. M. B., Conceição, M. L., & Souza, E. L. (2016). The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 183-192.
- Dong, Q., Yao, J., Yang, X.-T., & Fanga, J.-N. (2002). Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydrate Research*, 337, 1417–1421.
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., & Távarela, J. G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 77-84.

- Garcia, E. F., Araújo, A. O., Luciano, W. A., Albuquerque, T. M. R., Arcanjo, N. M. O., Madruga, M. S., & Santos, M. (2018). The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98 (13), 5000-5010.
- Guergoletto, K. B., Magnani, M., Martin, J. S., Andrade, C. G. T. J., & Garcia, S. (2010). Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 415-421.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44(2), 121–129.
- Hernandez-Hernandez, O., Muthaiyan, A., Moreno, F. J., Montilla, A., Sanz, M. L., & Ricke, S. C. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiology*, 30, 355–361.
- 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. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506–514.
- Iaconelli, C., Lemetais, G., Kechaou, N., Chain, F., Bermúdez-Humarán, L. G., Langella, P., Gervais, P., & Beneya, L. (2015). Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *Journal of Biotechnology*, 214, 17–26.
- Kim, D. K., Kim, S. J., & Kang, D. H. (2017). Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. *Food Research International*, 97, 280-287.

- Liao, N., Luo, B., Gao, J., Li, X., Zhao, Z., Zhang, Y., Ni, Y., & Tian, F. (2019). Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnology Letters*, 41(2), 263-272.
- Magnani, M., Calliari, C. M., Macedo Jr, F. C., Mori, M. P., Cólus, I. M. S., & Castro-Gomez, R. J. H. (2009). Optimized methodology for extraction of (1→3)(1→6)-β-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydrate Polymers*, 78, 658–665.
- Magnani, M., Castro-Gomez, R. H., Aoki, M. N., Gregório, M. P., Libos Jr, F., & Watanabe, M. A. E. (2010). Effects of carboxymethyl-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* on the peripheral blood cells of patients with advanced prostate cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1, 859-862.
- Ningtyas, D. W., Bhandari, B., Bansal, N., & Prakash, S. (2019). The viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (non-encapsulated and encapsulated) in functional reduced-fat cream cheese and its textural properties during storage. *Food Control*, 100, 8-16.
- Raymond, Y., & Champagne, C. P. (2015). The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. *Food Microbiology*, 46, 176-183.
- 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 Research International*, 90, 251-258.
- Ruthes, A. C., Carbonero, E. R., Córdova, M. M., Baggio, C. H., Santos, A. R. S., Sasaki, G. L., Cipriani, T. R., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2013). *Lactarius rufus* (1→3)(1→6)-β-D-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*, 94, 129–136.

- Santos, M. I., Gerbino, E., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E. E., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Stability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in the presence of galacto-oligosaccharides and lactulose as determined by near infrared spectroscopy. *Food Research International*, 59, 53–60.
- Shu, G., Wang, Z., Chen, L., Wan, H., & Chen, H. (2018). Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 70–76.
- Tang, Q., Huang, G., Zhao, F., Zhou, L., Huang, S., & Li, H. (2017). The antioxidant activities of six (1 → 3)- β -D-glucan derivatives prepared from yeast cell wall. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 216–221.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225–241.
- Tymczyszyn, E. E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gómez-Zavaglia, A., & Schebor, C. (2012). Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 217–221.

Figure captions

Supplementary Figure 1. ^{13}C RMN spectrum of water-insoluble (1→3)(1→6)- β -D-glucan from *S. uvarum* with indicated main chain carbons.

Figure 1. Log reduction of viable of cells of *L. acidophilus* LA-05(A), *L. plantarum*49 (B) and *L. plantarum* 201 (C) freeze-dried with ●: saline solution (control), ■: Y β G and ▲: FOS, as a function of the time of storage at 4 °C. The error bars represent the standard deviations.

Figure 2. Log reduction of viable of cells of *L. acidophilus* LA-05 (A, D, G), *L. plantarum*49 (B, E, H) and *L. plantarum*201 (C, F, I) freeze-dried with ●: saline solution (control), ■: Y β G and ▲: FOS, at the time 0 (A, B, C), 60 (D, E, F) and 120 (G, H, I) days of storage during *in vitro* digestion. The error bars represent the standard deviations.

Figure 3. Fluorescence density plots of *L. acidophilus* LA-05 (La05; A, B, C), *L. plantarum* 49 (Lp49; D, E, F) and *L. plantarum*201 (Lp201; G, H, I) in response to staining with PI immediately after freeze-drying with saline solution (A, D, G), Y β G (B, E, H), and FOS (C, F, I).

Figure 4. Fluorescence density plots of *L. acidophilus* LA-05 (La05; A, B, C), *L. plantarum* 49 (Lp49; D, E, F) and *L. plantarum*201 (Lp201; G, H, I) in response to staining with PI freeze-dried with saline solution (A, D, G), Y β G (B, E, H), and FOS (C, F, I) after 120 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).

Figure 5. Scanning electron micrograph of *L. plantarum* 201 immediately after freeze-dried with saline solution (A) and Y β G (B).

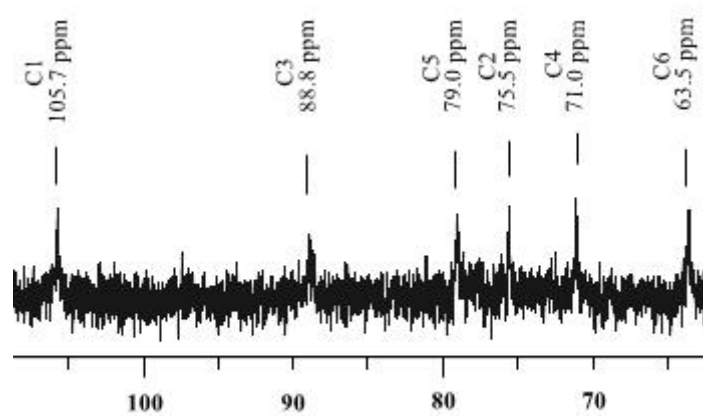


Fig. S1

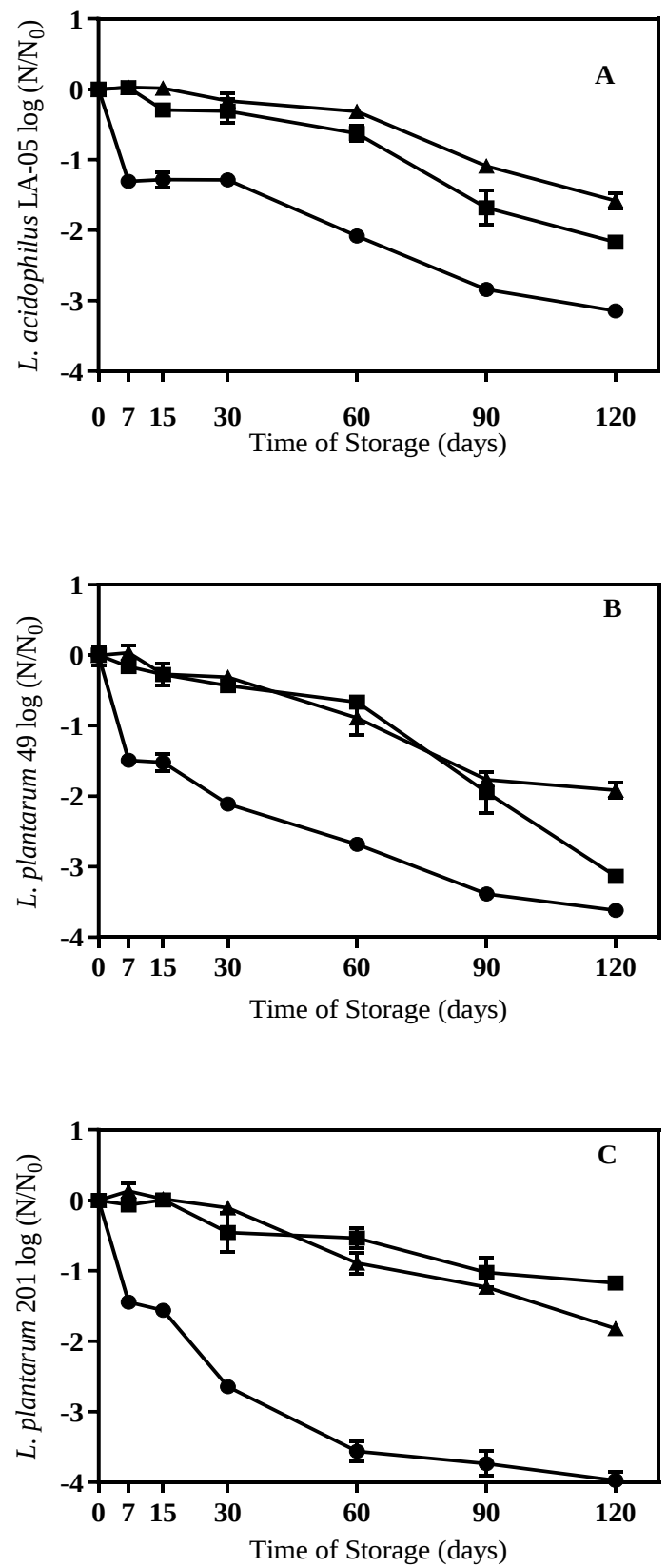


Fig. 1

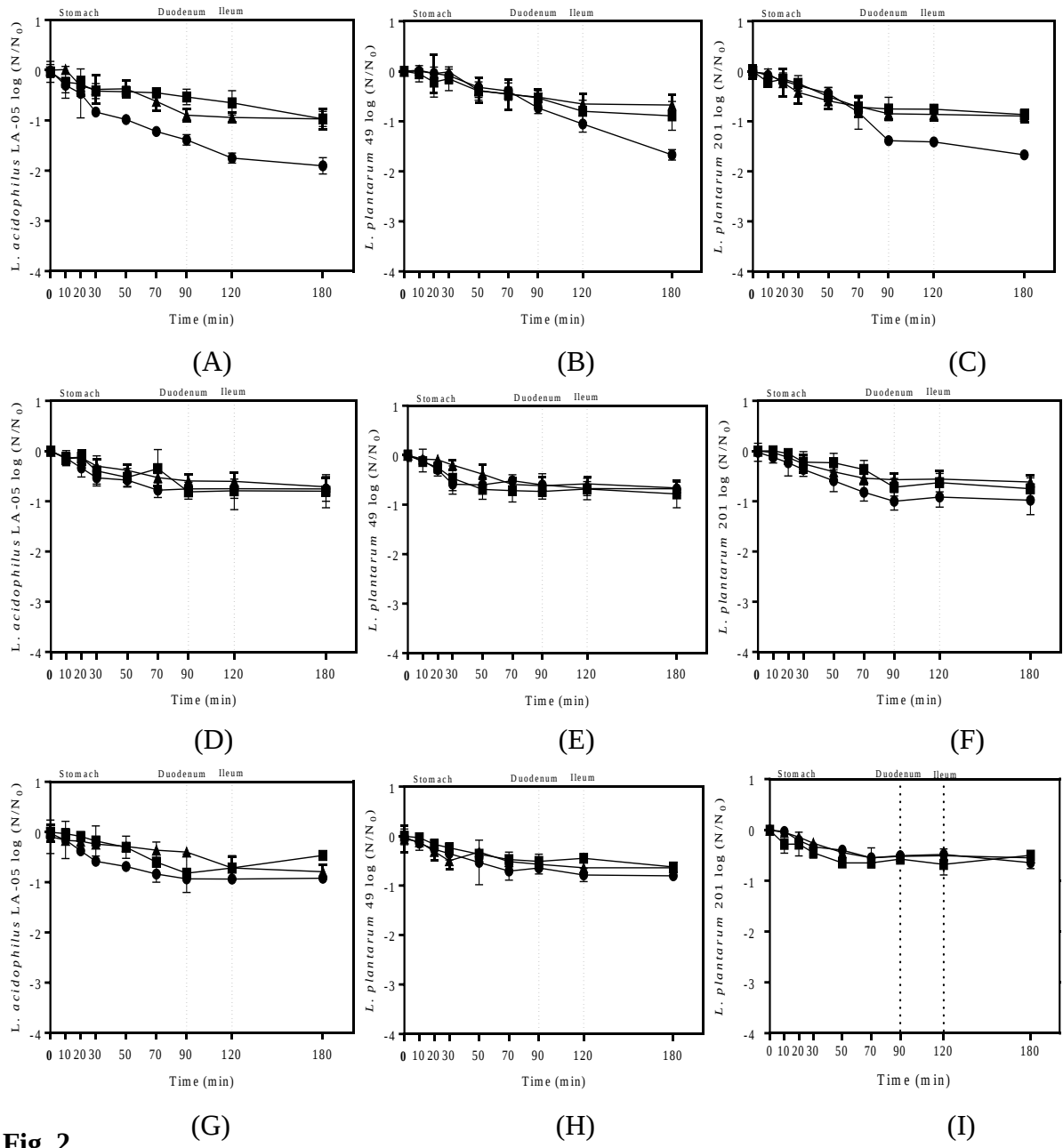


Fig. 2

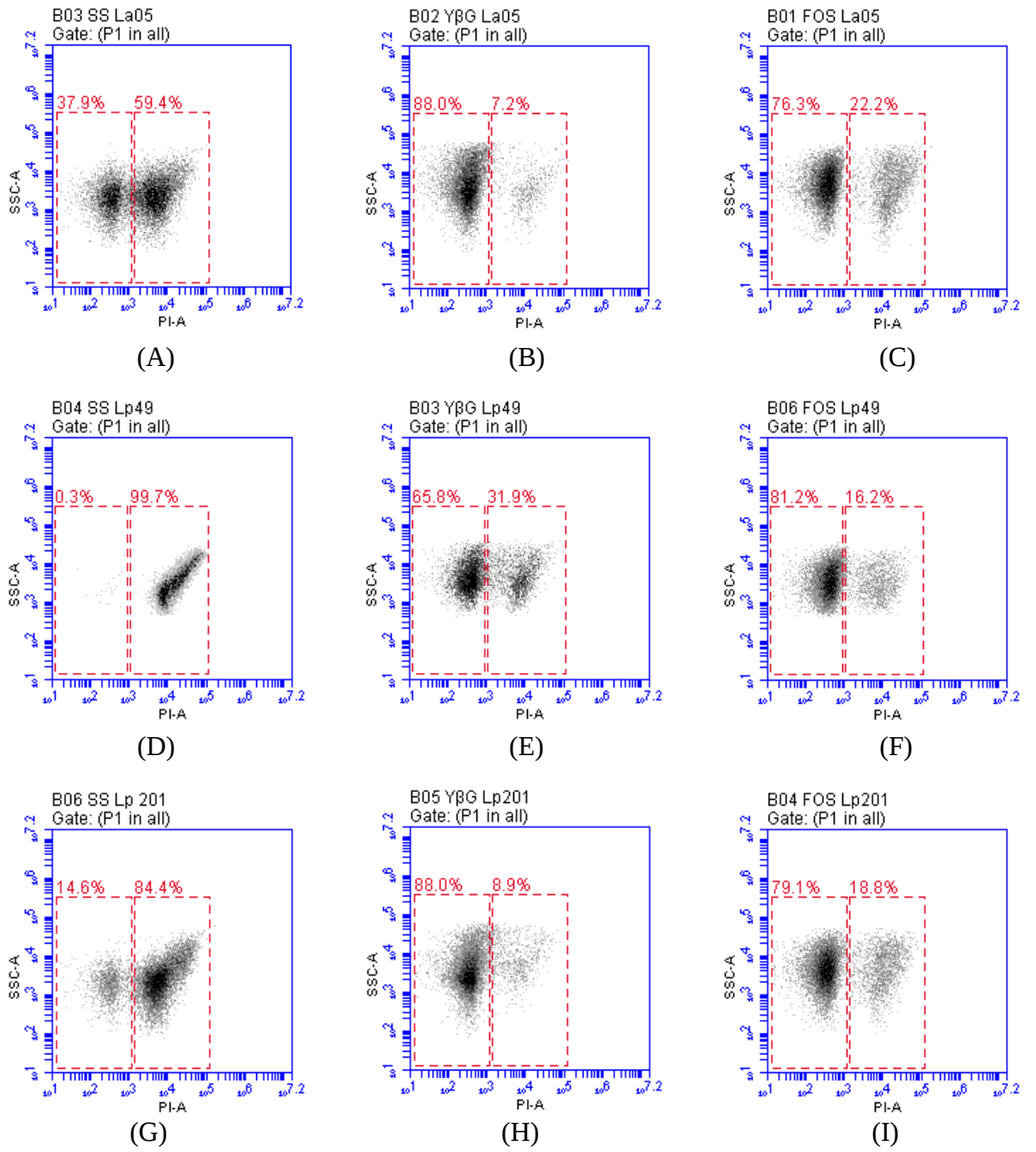


Fig. 3

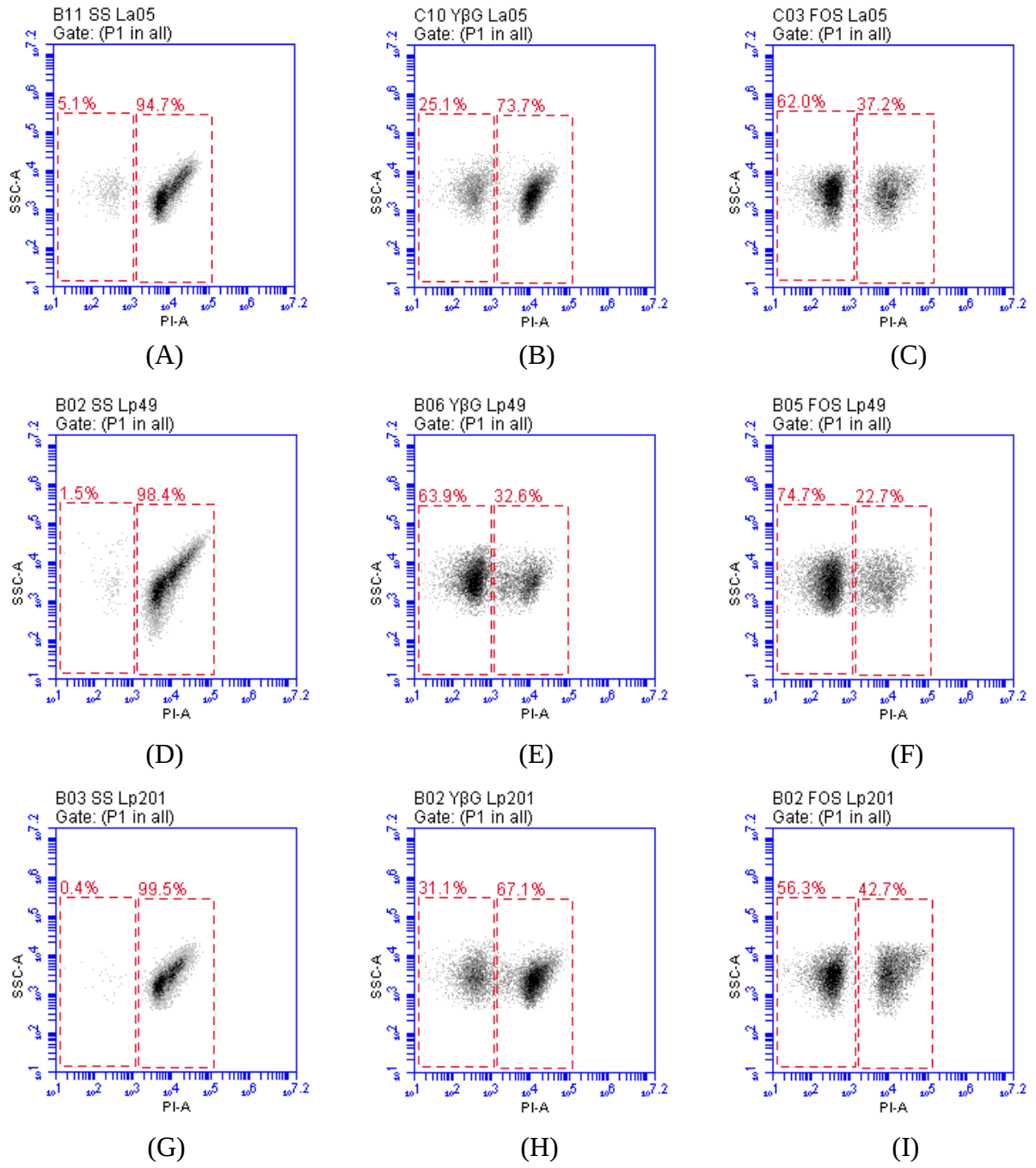


Fig. 4

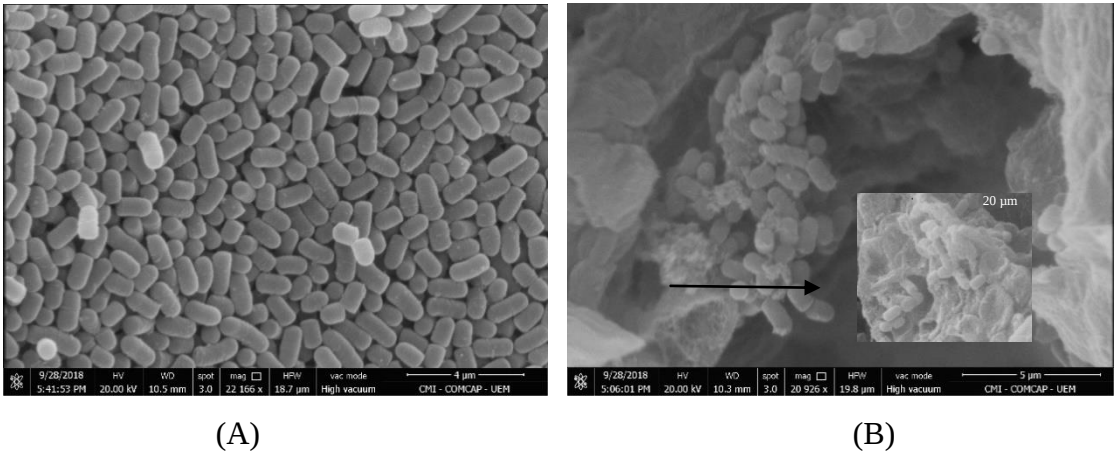


Fig. 5

Table 1. Viable cell counts of *Lactobacillus acidophilus* LA-05, *L. plantarum* 49 and *L. plantarum* 201 after freeze-drying with yeast β -glucan (Y β G) or fructooligosaccharides (FOS).

Probioticstrains	Cryoprotector	Before freeze-drying	After freeze-drying
<i>L. acidophilus</i> 05	Control	9.02 ± 0.10^a	7.85 ± 0.01^b
	Y β G	9.31 ± 0.11^a	8.44 ± 0.04^b
	FOS	9.74 ± 0.03^a	9.01 ± 0.09^b
<i>L. plantarum</i> 49	Control	9.12 ± 0.17^a	8.11 ± 0.13^b
	Y β G	9.51 ± 0.10^a	8.77 ± 0.03^b
	FOS	9.78 ± 0.08^a	9.03 ± 0.07^b
<i>L. plantarum</i> 201	Control	9.25 ± 0.13^a	8.34 ± 0.01^b
	Y β G	9.21 ± 0.15^a	8.31 ± 0.01^b
	FOS	9.51 ± 0.16^a	8.70 ± 0.04^b

Control: Saline solution; a–b different superscript small letters in the same row denotes difference ($p < 0.05$) among the counts of cells before and after freeze-drying, based on the t-test.