



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

NOÁDIA PRISCILA ARAÚJO RODRIGUES

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO
ISOLADAS DE FRUTAS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA
DE *Limosilactobacillus fermentum* EM SUCOS DE FRUTAS**

João Pessoa

2021

NOÁDIA PRISCILA ARAÚJO RODRIGUES

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO
ISOLADAS DE FRUTAS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA
DE *Limosilactobacillus fermentum* EM SUCOS DE FRUTAS**

João Pessoa

2021

NOÁDIA PRISCILA ARAÚJO RODRIGUES

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO
ISOLADAS DE FRUTAS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA
DE *Limosilactobacillus fermentum* EM SUCOS DE FRUTAS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

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

João Pessoa

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

R696s Rodrigues, Noadia Priscila Araujo.

Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de frutas e avaliação da capacidade de sobrevivência de *Limosilactobacillus fermentum* em sucos de frutas / Noadia Priscila Araujo Rodrigues. - João Pessoa, 2021.

139 f. : il.

Orientação: Evandro Leite de Souza.

Coorientação: Estefânia Fernandes Garcia.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Alimentos funcionais. 2. *Lactobacillus* spp. 3. Testes de segurança. 4. Propriedades tecnológicas. 5. Análise multivariada. I. Souza, Evandro Leite de. II. Garcia, Estefânia Fernandes. III. Título.

UFPB/BC

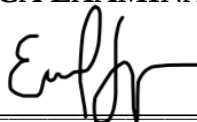
CDU 641.1(043)

NOÁDIA PRISCILA ARAÚJO RODRIGUES

**SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO
ISOLADAS DE FRUTAS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA
DE *Limosilactobacillus fermentum* EM SUCOS DE FRUTAS**

Tese de doutorado defendida em 28 / 04 / 2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Evandro Leite de Souza
Presidente da Banca examinadora



Prof. José Luiz de Brito Alves
Examinador interno titular



Profa. Maria Elieidy Gomes de Oliveira
Examinador interno titular

Profa. Jossana Pereira de Sousa Guedes
Examinador externo titular

Profa. Roberta Albuquerque Bento da Fonte
Examinador externo titular

Dedico esse trabalho a Benedita e Iracema (in memoriam), minhas avós, pelo incentivo e amor. E por demonstrarem que é possível florescer em solos áridos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em quem estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e da ciência, pelo privilégio desta conquista.

Aos meus pais Justino e Josilva, meus irmãos Daniel Berg e Talytta, cunhados Deyvid e Jéssica, pelo companheirismo, socorro e diversão que oferecem, sempre. E por estarem sempre dispostos a me ajudar. Aos meus sobrinhos Ana Louise, Isadora, Davi, Rebeca e Elisa por me proporcionarem tanta alegria. Amo vocês.

A minha grande família: avós, tios e primos, por estarem sempre juntos, mesmo que distantes, em alguns momentos, e por serem a válvula de escape em dias de grande tensão, porque todas as coisas se tornam menos difíceis e mais felizes quando estou com vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Evandro Leite de Souza, por ter me conduzido nesta jornada de conhecimento e amadurecimento acadêmico e profissional, pela inspiração e criatividade nas orientações e contribuições para o trabalho e para o exercício da docência.

A minha co-orientadora e amiga Prof^a Dra Estefânia Fernandes Garcia, por todo apoio, ensino e disponibilidade.

A Prof^a Dra Maria Lúcia da Conceição, pela inspiração, desde a graduação em nutrição, quando me ofereceu a oportunidade de ingressar a iniciação à pesquisa e à docência.

À querida equipe do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos do Departamento de Nutrição da UFPB (LMBA) formada pelas servidoras Sônia e Heloísa e pela pós-doutoranda Kataryne, por todo companheirismo e apoio durante as atividades no laboratório.

A todos os colegas discentes da Pós-Graduação em Ciências da Nutrição da UFPB, em especial àqueles com quem convivi no LMBA, a exemplo de Aldeir, Ana Cristina, Érika Thayse, Francisca Nayara, Giovanna, Isabella, Karina, Karoline Sampaio, Mayara, Nayara Massa, por tornarem a rotina de estudos e análises mais leve e mais feliz.

Às amigas Shirley, Aila, Melina, Agnise, Geovanna Paiva, Milena Luana, Lillian, pela rede de apoio, orações, conversas e desabafos tão importantes durante esta fase.

À querida igreja Cidade Viva pelas orações desde que decidi ingressar na pós-graduação.

Ao Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da UFPB, bem como ao Departamento de Gastronomia da UFPB, pela concessão da licença nestes últimos dois anos, a fim de concluir o doutorado.

Às amigas e colegas deste Departamento, Prof^a Dra Ingrid Dantas e Prof^a Dra Patrícia Pinheiro por todo apoio e incentivo, e por terem assumido minhas disciplinas para que eu pudesse me dedicar integralmente ao doutorado.

A banca examinadora desta tese, por todas as correções e sugestões tão enriquecedoras.

Ao Departamento de Nutrição da UFPB e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, responsáveis pela minha formação profissional.

Muito obrigada!

*“A natureza tem perfeições para demonstrar
que é a imagem de Deus e imperfeições para
provar que só é uma imagem.”*

Blaise Pascal

RESUMO

O desenvolvimento de alimentos funcionais a base de frutas adicionados de probióticos ainda é um desafio para a indústria, o que demonstra a necessidade de se obter isolados com capacidade de se adaptarem a estas matrizes. O objetivo deste estudo foi selecionar isolados de bactérias lácticas (BAL) de amostras de banana, laranja, maçã e uva, por meio de suas características probióticas e tecnológicas *in vitro* e sobrevivência em diferentes matrizes alimentares e verificar a capacidade de sobrevivência de duas cepas de *Limosilactobacillus fermentum* isolados de subprodutos do processamento de frutas em sucos de laranja e maçã durante o armazenamento refrigerado e quando expostos à digestão gastrointestinal simulada. Procedeu-se o isolamento, caracterização fenotípica e pré-identificação dos isolados obtidos das amostras de frutas, seguindo-se pela realização de testes de segurança e exclusão de amostras não seguras. Posteriormente, foram realizados testes *in vitro* para avaliar o potencial probiótico e tecnológico dos isolados remanescentes. Por meio do uso de análises estatísticas multivariadas, os isolados mais promissores foram selecionados, identificados por sequenciamento do gene 16S-rRNA e avaliados quanto a capacidade de sobrevivência em diferentes matrizes alimentares. Duas cepas de *Limosilactobacillus fermentum* isoladas em estudos prévios de subprodutos do processamento de frutas, previamente caracterizados como candidatas para uso como probióticos em alimentos foram incorporadas em sucos de maçã e laranja e avaliados quanto a sua capacidade de sobrevivência durante armazenamento refrigerado e quando submetidas ao processo de digestão simulado. Foram obtidos 93 isolados de BAL das amostras de frutas, porém 27 isolados foram excluídos nos testes de segurança. Entre os 66 isolados remanescentes, quatro foram selecionados como mais promissores e seguros com base nos testes tecnológicos e de potencial probiótico para uso em alimentos, os quais foram identificados como *Lactobacillus* sp. ou *Levilactobacillus brevis*. Estes isolados apresentaram boa capacidade de sobrevivência durante 28 dias de armazenamento refrigerado com contagens viáveis >6 log de UFC/mL e percentual de células metabolicamente ativas entre 26 e 72%, ao final do período, em sucos de frutas, purê de vegetais, ensopado de carnes e leite UHT. Os dois isolados de *L. fermentum* com potencial probiótico derivados de subprodutos do processamento de frutas quando inoculados em sucos de maçã e laranja apresentaram boa capacidade de sobrevivência, indicado por elevadas contagens de células viáveis (>6 log de UFC/mL durante refrigeração e >4 log de UFC/mL ao longo do TGI) e de subpopulações fisiologicamente ativas (>30%), durante 28 dias de armazenamento refrigerado, bem como quando submetidos à digestão simulada nestes substratos. Os resultados deste estudo mostraram que frutas podem ser fontes de isolados de BAL com potencial probiótico e que um protocolo incluindo isolamento, caracterização fenotípica, exclusão com testes de segurança e seleção com base em propriedades tecnológicas e fisiológicas pode ser aplicado para obtenção de isolados com propriedades compatíveis para uso como probióticos e com capacidade de sobrevivência em diferentes matrizes alimentares, e também que isolados de subprodutos de frutas quando inoculados em sucos de frutas têm potencial de sobrevivência ao longo do armazenamento refrigerado e durante digestão.

Palavras-chave: Alimentos funcionais. *Lactobacillus* spp. Testes de segurança. Propriedades tecnológicas. Análise multivariada.

ABSTRACT

The development of functional fruit-based foods with probiotics is still a challenge for the industry, which demonstrates the need to obtain isolates with the ability to adapt to these matrices. The aim of this study was to select isolates of lactic acid bacteria (BAL) from banana, orange, apple and grape samples, through their probiotic and technological characteristics *in vitro* and survival in different food matrices and to verify the viability of two strains of *Limosilactobacillus fermentum* isolated from products of fruit processing in orange and apple juices during refrigerated storage and when exposed to simulated gastrointestinal digestion. Isolation, phenotypic characterization and pre-identification of isolates obtained from fruit samples were carried out, followed by safety tests and exclusion of unsafe samples. Subsequently, *in vitro* tests were carried out to assess the technological and probiotic potential of the remaining isolates. Through the use of multivariate statistical analyzes, the most promising isolates were selected, identified by sequencing the 16S-rRNA gene and evaluated for their ability to survive in different food matrices. Two strains of *Limosilactobacillus fermentum* isolated in previous studies of fruit processing by-products, previously characterized as presumably for use as probiotics in food, were incorporated into apple and orange juices and evaluated for their ability to survive during refrigerated storage and when subjected to the simulated digestion process. 93 BAL isolates were obtained from fruit samples, but 27 isolates were excluded in safety tests. Among the remaining 66 isolates, four were selected as the most promising and safe for use in food based on technological tests and probiotic potential for use in food, which were identified as *Lactobacillus* sp. or *Levilactobacillus brevis*. These isolates showed good survival capacity for 28 days of cold storage with viable counts > 6 log CFU / mL and percentage of metabolically active cells between 26 and 72%, at the end of the period, in fruit juices, vegetable puree, meat stew and UHT milk. The two isolates of *L. fermentum* with probiotic potential derived from fruit by-products when inoculated in apple and orange juices showed good survival capacity, as indicated by high viable counts (>6 log CFU/mL during refrigeration and >4 log CFU/mL in TGI) and by physiologically active cell subpopulations (>30%), during 28 days of cold storage as well as when exposed to a simulated digestion in these substrates. The results of this study showed that fruits can be sources of LAB isolates with probiotic potential and that a protocol including isolation, phenotypic characterization, exclusion with safety tests and selection based on technological and physiological properties can be applied to obtain isolates with properties compatible for use as probiotics and with ability of survive in different food matrices, and also those isolated from fruit by-products when inoculated in fruit juices have potential for survival during refrigerated storage and during simulated digestion process.

Key words: Functional foods. *Lactobacillus* spp. Safety tests. Technological properties. Multivariate analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DA TESE

Figura 1: Imagem tridimensional do tubo intestinal onde é possível visualizar bactérias lácticas com morfologia de cocos e bacilos compondo a microbiota intestinal.	21
Figura 2: Alimentos enriquecidos com bactérias probióticas e seus efeitos promotores de saúde.	26
Figura 3: Código QR para acessar vídeo da <i>Nature Immunology</i> com estruturas de células intestinais e mecanismo de ativação do sistema imunológico.	27
Figura 4: Mecanismo de regulação da imunidade inata pela microbiota.	28
Figura 5: Fluxograma do desenvolvimento de alimentos probióticos a partir de alimentos de origem vegetal.	33
Figura 6: Fatores que interferem na viabilidade de cepas de probióticos em alimentos	34
Figura 7: Parâmetros considerados ideais para uma matriz alimentar carreadora de probióticos.	36
Figura 8: Código QR para acessar fotografias de etapas metodológicas e obtenção de resultados.	67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS DO 1º ARTIGO

- Figura 1: Cluster analysis run of lactic acid bacteria isolates from fruit. Differences were computed as dissimilarities and results of assays of acidification capacity, proteolytic activity and exopolysaccharide and diacetyl production were used as input variables. Dashed line represents the cut-off point to detection of clusters. 105
- Figura 2: Principal Component Analysis (PCA) run for lactic acid bacteria isolates of cluster 1 (A – B), cluster 2 (B –C) and cluster 3 (D – E) with both case projection (distribution of isolates in factorial space) and variable projection to acid tolerance, survival with 0.5% bile salts, hydrophobicity, auto-aggregation capacity and bile salt hydrolase activity. Map of the location of variables in factorial space (A, C and D). Principal Component Analysis (PCA) diagram for lactic acid bacteria isolates (B, D and E). 106
- Figura 3: Viable counts (CFU/mL) of the 4 selected isolates selected as having the most promising probiotic-related characteristics in different foods during 28 days of refrigeration storage (4 ± 0.5 °C). 107

FIGURAS DO 2º ARTIGO

- Figura 1: Output of redundancy analysis (RDA) showing the relationship between physiological characteristics of *Limosilactobacillus fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells in apple and orange juices during 28 days of refrigerated storage with physicochemical parameters measured in these juices. 138

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELAS E QUADROS DA TESE

Quadro 1: Estudos que utilizaram comparação de médias na pesquisa com probióticos	39
Quadro 2: Estudos que utilizaram classificação na pesquisa com probióticos	40
Quadro 3: Estudos que utilizaram ordenação na pesquisa com probióticos	41
Quadro 4: Estudos que utilizaram regressões múltiplas multivariadas na pesquisa com probióticos.	42
Tabela 1: Coletas realizadas das amostras de frutas para isolamento de bactérias lácticas.	44
Tabela 2: Antibióticos* utilizados e suas concentrações em disco.	49
Tabela 3: Critérios de avaliação da suscetibilidade a antibióticos de acordo com o diâmetro da zona de inibição do crescimento.	50
Tabela 4: Códigos qualitativos utilizados para análises multivariadas.	58

TABELAS E QUADROS DO 1º ARTIGO

Tabela 1: Qualitative codes used for multivariate analysis (Cluster and Principal Component Analysis).	103
Tabela 2: The size (%) of subpopulations of 4 selected isolates as having the most promising probiotic-related characteristics in different foods during 28 days of refrigeration storage (4 ± 0.5 °C).	104
Tabela S1: Initial identification and score of identification of lactic acid bacteria isolates from fruit with MALDI-ToF MS technique.	108
Tabela S2: Technological characteristics of lactic acid bacteria isolates from fruit grouped in cluster 1, 2 and 3.	109
Tabela S3: Antibiotic susceptibility profile of 9 lactic acid bacteria isolates selected as having the most promising probiotic-related characteristics based on PCA.	110
Tabela S4: Antagonistic activity of 4 lactic acid bacteria isolates selected as having the most promising probiotic-related characteristics against <i>E. coli</i> and <i>L. monocytogenes</i> based on PCA. Results are expressed as growth inhibition zones (mm, average $\pm$ standard deviation).	111

TABELAS E QUADROS DO 2º ARTIGO

Tabela 1: Values of physicochemical parameters of apple and orange juice inoculated with <i>Limosilactobacillus fermentum</i> 139 and <i>L. fermentum</i> 263 during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).	135
Tabela 2: Viable counts (Log CFU/mL) of <i>Limosilactobacillus fermentum</i> 139 and <i>L. fermentum</i> 263 and sizes (%) of their subpopulations with different physiological characteristics in apple and orange juice during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).	136
Tabela 3: Viable counts (Log CFU/mL) of <i>L. fermentum</i> 139 and <i>L. fermentum</i> 263 and sizes (%) of their subpopulations with different physiological characteristics in MRS broth and apple and orange juice when exposed to different steps of a simulated gastrointestinal digestion.	137

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
BAL	Bactérias lácticas
BOX	Ácido bis-1,3-dibutilbarbutírico
CA	<i>Correspondence Analysis</i> (análise de correspondência)Análise de Correspondência
CCA	<i>Canonical Correspondence Analysis</i> (análise de correspondência canônica)Análise de Correspondência canônica
cFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
CO₂	Gás carbônico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPS	Exopolissacarídeo
FA	<i>Factor analysis</i> (Análise fatorial)Análise fatorial
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i> (tecidos linfoides associados ao intestino)
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i> (Presumivelmente geralmente reconhecidos como seguros)
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
IL	Interleucina
KOH	Hidróxido de potássio
LMBA	Laboratório de microbiologia e bioquímica de alimentos
LPS	Lipopolissacarídeos
MALDI-Tof	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight (Espectrometria de massas em ionização por dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo)
MAMPs	<i>Microbe-associated molecular pattern</i> (Padrões moleculares associados a microrganismos)
MANOVA	Análise de variância multivariada
MO	Micro-organismos
MRS	<i>Ágar De Man, Rogosa e Sharpe Ágar</i> (Ágar de Man, Rogosa e Sharpe)
NaOH	Hidróxido de Sódio
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear kappa B)
NLRP6	<i>NOD like receptors family pyrin domain containing 6</i> (Receptor semelhante ao ND da família de domínio das pirinas)

NMDS	<i>Non-metric multidimensional scaling</i> (Escalonamento multidimensional não métrico) - NMDS
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i> (domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos)
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> (Padrão molecular associado à patógeno)
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PCA	<i>Principal component analysis</i> (Análise de componentes principais)
PCoA	<i>Principal Coordinates Analysis</i> (Análise de coordenadas principais)
PI	Iodeto de propídio
QPS	<i>qualified presumption of safety</i> (presumivelmente qualificados como seguros)
RDA	<i>Redundancy analysis</i> (Análise de redundância)
RIP2	<i>Receptor-interacting protein kinase 2</i> (Proteína quinase 2 de interação com receptor)
STF	Solução salina tamponada com fosfato
TGI	Trato gastrointestinal
TLR	<i>toll-like receptors</i> (receptores do tipo Toll)
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 BACTÉRIAS LÁTICAS	21
2.2 BENEFÍCIOS DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS	26
2.3 USO DE PRODUTOS VEGETAIS PARA VEICULAÇÃO DE PROBIÓTICOS	32
2.4 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS PARA SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM PROPRIEDADES PROBIÓTICAS	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 AMOSTRAS	44
3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS	45
3.3 IDENTIFICAÇÃO PRÉVIA DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM IONIZAÇÃO POR DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ-TEMPO DE VOO	46
3.4 TESTES DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DOS ISOLADOS	47
3.4.1 Testes de segurança	47
3.4.1.1 Atividade hemolítica	47
3.4.1.2 Atividade mucinolítica	47
3.4.1.3 Atividade da gelatinase	48
3.4.1.4 Atividade da DNase	48
3.4.1.5 Produção de aminas biogênicas	48
3.4.1.6 Suscetibilidade a antibióticos	49
3.4.2 Testes de potencial tecnológico	50
3.4.2.1 Atividade proteolítica	50
3.4.2.2 Produção de diacetil	51
3.4.2.3 Produção de exopolissacarídeos	51
3.4.2.4 Tolerância a diferentes concentrações de NaCl	52
3.4.2.5 Capacidade de acidificação	52
3.4.3 Testes de potenciais efeitos fisiológicos <i>in vitro</i>	53
3.4.3.1 Tolerância a meio ácido e a concentrações de sais de bile	53
3.4.3.2 Desconjugação de sais biliares	53

3.4.3.3 Hidrofobicidade da superfície celular	54
3.4.3.4 Autoagregação	54
3.4.3.5 Antagonismo frente a bactérias patogênicas	55
3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS SELECIONADOS	56
3.6 SELEÇÃO DOS ISOLADOS MAIS PROMISSORES PARA USO COMO PROBIÓTICOS	57
3.6.1 Primeira seleção	57
3.6.2 Segunda seleção	58
3.7 SOBREVIVÊNCIA DOS ISOLADOS SELECIONADOS EM DIFERENTES MATRIZES ALIMENTARES	58
3.7.1 Preparo dos isolados	58
3.7.2 Preparo das matrizes alimentares adicionadas dos isolados	59
3.7.3 Avaliação do estado fisiológico dos isolados selecionados em diferentes matrizes alimentares	59
3.7.3.1 Procedimento de coloração	59
3.7.3.2 Análises em citometria de fluxo	60
3.7.3.3 Interpretação dos resultados	61
3.8 ADIÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Limosilactobacillus fermentum</i> EM SUCOS DE FRUTAS	62
3.8.1 Isolados e preparo dos inóculos	62
3.8.2 Sucos de frutas	62
3.8.3 Parâmetros físico-químicos dos sucos inoculados com <i>L. fermentum</i> durante o armazenamento	63
3.8.3.1 Acidez titulável	63
3.8.3.2 pH	63
3.8.3.3 Sólidos solúveis totais	63
3.8.4 Contagens de células viáveis de <i>L. fermentum</i> em suco de maçã e laranja durante o armazenamento refrigerado	64
3.8.5 Contagens de células viáveis de <i>L. fermentum</i> em suco de maçã e laranja durante a digestão gastrointestinal simulada	64
3.8.6 Estado fisiológico de <i>L. fermentum</i> em sucos de maçã e laranja durante armazenamento refrigerado e quando exposto à digestão simulada	65
3.8.6.1 Procedimento de coloração	65

3.8.6.2 <i>Análise de dados e interpretação dos resultados</i>	66
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS ADICIONAIS	66
4 RESULTADOS	68
REFERÊNCIA	71
APÊNDICE A – ARTIGO 1: Selection of lactic acid bacteria with probiotic aptitudes from fruit using measurements of in vitro technological and functional properties combined with multivariate statistical analysis and survival in different food matrices	82
APÊNDICE B – ARTIGO 2: Combined assessment of viable counts and physiological states of fruit-derived probiotic <i>Limosilactobacillus fermentum</i> to investigate the suitability of apple and orange juice as delivery vehicles	112

1 INTRODUÇÃO

A Busca por alimentos que promovam benefícios a saúde tem aumentado nos últimos anos, sobretudo pelo fato dos consumidores estarem mais conscientes quanto ao efeito das escolhas alimentares para a saúde e longevidade (GALANAKIS, 2021; SUBHASHREE; KAVITA, 2019; NEFFE-SKOCINSKA et al., 2018; RAJOKA et al., 2017). O que tem promovido maior interesse por alimentos que contém (GUIMARÃES et al., 2020; NEFFE-SKOCINSKA et al., 2018).

Os probióticos são conceituados como micro-organismos vivos capazes de promover benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (ANVISA, 2019; FAO/WHO, 2006; HILL et al., 2014). Dentre os micro-organismos com atividade probiótica veiculados em alimentos, destacam-se as bactérias láticas, que se caracterizam como um vasto grupo de micro-organismos com características taxonômicas e filogenéticas distintas, mas que se reúnem por produzirem ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos. Os principais gêneros de bactérias láticas são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, com destaque para o gênero *Lactobacillus* (KUMAR et al., 2015; RIVERA-ESPINOZA et al., 2010). Com o avanço das técnicas de biologia molecular, o gênero *Lactobacillus*, que possuía mais de 250 espécies, foi reclassificado em 25 gêneros diferentes (ZHEN et al., 2020)

Os alimentos contendo probióticos mais disponíveis no mercado são aqueles à base de leite, tais como iogurte e leites fermentados. Entretanto, cepas probióticas utilizadas em produtos lácteos possuem baixa capacidade de sobrevivência em produtos de origem vegetal devido às diferenças nas características das matrizes (SUBHASHREE; KAVITA, 2019). O crescente número de indivíduos com intolerância à lactose, dislipidemias, alergias às proteínas do leite, ou com adoção de estilo de vida vegano ou outras tendências alimentares que excluem o consumo de alimentos de origem animal, tem elevado a busca dos consumidores por alimentos à base de vegetais contendo probióticos (CHEN et al., 2017; MIN et al., 2019; SUBHASHREE; KAVITA, 2019).

Apesar dos alimentos e bebidas à base de vegetais estarem entre as preferências dos consumidores e recomendados nos principais guias alimentares, estes substratos são considerados ambientes de difícil sobrevivência para a maioria das cepas de probióticos devido ao baixo pH e presença de compostos com propriedades antimicrobiana, tais como taninos, fenólicos e ácidos orgânicos. Todavia, estudos têm demonstrado que cepas de probióticos isolados de vegetais podem apresentar mecanismos de adaptação que facilitam sua

sobrevivência nestes tipos de alimento (GARCIA et al., 2016; GOMAND et al., 2019; REDDY et al., 2015). Tais aspectos são importantes, visto que, para exercer benefícios sobre a saúde dos consumidores, os probióticos devem manter elevada população de células viáveis e funcionais quando expostos às condições de processamento, estocagem e passagem pelo trato gastrointestinal humano (GAUCHER, 2019; TRIPATHI; GIRI, 2014).

Tem sido relatado que frutas apresentam características próprias que podem se assemelhar às encontradas no trato gastrointestinal humano, como acidez, superfícies irregulares que estimulam a adesão celular, e presença de fatores anti-nutricionais. E, devido à exposição às condições intrínsecas das matrizes vegetais, as bactérias isoladas dessas fontes podem apresentar melhor adaptação às condições de processamento, armazenamento e às do ambiente gastrointestinal (FILANNINO et al., 2018; GEORGE et al., 2018; KUMAR et al., 2015).

Os alimentos de origem vegetal, além de fornecerem substrato para fermentação láctica com produção de metabólitos tecnologicamente favoráveis para a indústria de alimentos, caracterizam-se como *habitats* naturais de algumas bactérias lácticas (BAL). Portanto, a seleção de BAL com características probióticas a partir de fontes vegetais pode auxiliar na obtenção de cepas com características diferenciadas de sobrevivência em alimentos ou bebidas à base de vegetais (GEORGE et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2020; SIMONE, 2019).

Desta forma, torna-se importante a realização de estudos com ênfase no isolamento de cepas de BAL com potencial probiótico que apresentem contagens de células viáveis satisfatórias quando inseridas em alimentos e bebidas à base de frutas, sem causar, todavia, alterações indesejáveis nas características de qualidade destes produtos (MIN et al., 2019). Pelo fato das BAL promoverem importantes características tecnológicas aos produtos em que são inseridas e também oferecer benefícios à saúde, tem ocorrido aumento do interesse pela realização de pesquisas com foco na identificação, classificação e avaliação de aplicações tecnológicas desse grupo de micro-organismos (GOMAND et al., 2019; LINARES et al., 2017; SUBHASHREE; KAVITA, 2019).

A fim de facilitar a seleção a partir dos diversos parâmetros observados na escolha de bactérias com propriedades tecnológicas e probióticas, recomenda-se o uso de técnicas quimiométricas, que são ferramentas estatísticas aplicadas a análises químicas. A aplicação de métodos estatísticos de análise multivariada possibilita a observação simultânea de vários parâmetros para a tomada de decisão. Estas ferramentas são consideradas técnicas robustas que facilitam a classificação, organização, ordenamento e correlação dos dados multivariados de

avaliação de propriedades de interesses em grupos de isolados bacterianos (GRANATO et al., 2018; KEMSLEY et al., 2019; TRUONG et al., 2019).

Com base nesses aspectos, esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de selecionar isolados de bactérias lácticas (BAL) de amostras de banana, laranja, maçã e uva, por meio de suas características probióticas e tecnológicas *in vitro* e sobrevivência em diferentes matrizes alimentares, e verificar a capacidade de sobrevivência de duas cepas de *Limosilactobacillus fermentum* isoladas de subprodutos do processamento de frutas com características probióticas previamente avaliadas *in vitro* e *in vivo* (GARCIA et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2019; CAVALCANTI NETO et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2020) quando incorporadas em sucos de laranja e maçã durante o armazenamento refrigerado e quando expostos à digestão gastrintestinal simulada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BACTÉRIAS LÁTICAS

As BAL são micro-organismos capazes de fermentar carboidratos com produção de diferentes metabólitos, destacando-se o ácido láctico como metabólito principal do processo fermentativo. Foram nomeadas assim, pela primeira vez, em 1884, ao atribuírem-lhes a responsabilidade pela coagulação do leite. A partir de então, ocorreu o início de estudos sobre o conceito deste grupo de micro-organismos (GEORGE et al., 2018; SIMONE, 2019; WU et al., 2017). As BAL constituem-se em um grupo heterogêneo de micro-organismos morfológicamente e taxonomicamente distintos, que se apresentam na forma de cocos ou bastonetes Gram-positivos, como pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1 - Imagem tridimensional do tubo intestinal onde é possível visualizar bactérias láticas com morfologia de cocos e bacilos compondo a microbiota intestinal.



FONTE: Elaborada pela autora com fotografias disponíveis no site canva.com

Ademais, não formam esporos, não produzem catalase (embora em meios contendo baixa concentração de açúcares uma pseudo-catalase pode ser detectada) e, quase sempre, não possuem motilidade (embora poucas espécies possuam flagelos) e são anaeróbias facultativas ou microaerófilas (GOMAND et al., 2019; WU et al., 2017). A longa história de uso seguro de BAL conferiram-lhes o perfil de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) ou QPS (*Qualified Presumption of Safety*) pelo fato de estarem presentes em grande diversidade de alimentos e por seu papel na saúde da microbiota humana (FDA, 1997; RAJOKA et al., 2017; RICCI et al., 2017).

Com o avanço dos estudos em biologia molecular foi possível classificar e reorganizar as BAL quanto as suas características filogenéticas e taxonômicas e, pelo fato de algumas das características probióticas apresentadas pelas BAL serem cepa-dependente, considera-se importante identificar e caracterizar detalhadamente tais cepas. Alguns autores fazem distinção entre *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* e demais BAL devido às suas características filogenéticas, como conteúdo e perfil de bases de DNA. Espécies de *Bifidobacterium* possuem conteúdo superior de bases guanina e citosina, diferentemente das demais BAL (AGRIOPOULOU et al., 2020; GEORGE et al., 2018; GOMAND et al., 2019; SUN et al., 2015).

Estes estudos permitiram incluir seis famílias ao grupo de BAL, compostas por 38 gêneros e pertencentes à ordem *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, do filo *Firmicutes*. Os gêneros de BAL encontrados em alimentos são: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Mlissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Melissococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* e *Weisella* (AGRIOPOULOU et al., 2020; DOMINGOS-LOPES et al., 2017; MAMHOUD et al., 2016; ZINNO et al., 2017).

Destas, os gêneros tradicionalmente envolvidos na produção de alimentos são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, devido a sua contribuição no desenvolvimento de aromas, sabores e manutenção da vida de prateleira do produto. Os *Enterococcus*, dependendo de sua origem, podem agir como patógenos, deteriorantes ou comensais e serem utilizados como probióticos (GEORGE et al., 2018; REID, 2016). Dentre as mais de 260 espécies de *Lactobacillus* já identificadas, 25 são definidas como BAL frutofílicas por habitarem nichos abundantes em frutose, como flores e frutas (AGRIOPOULOU et al., 2020; GEORGE et al., 2018).

Em relação aos aspectos bioquímicos, as BAL possuem atividade metabólica em comum, que é a capacidade de produzir ácido láctico por meio da fermentação de açúcares. O processo metabólico utilizado, bem como a concentração dos produtos formados pode variar e, de acordo com a via metabólica, pode-se classificar as BAL em dois grupos: i) homofermentativas, que são as mais eficientes (90 a 95%) na produção de lactato; e ii) heterofermentativas, que, além de ácido láctico como resultado do processo fermentativo, produzem quantidades significativas de etanol, acetato e/ou dióxido de carbono (COSTA; ROSA, 2016; KAREB; AIDER, 2019).

Dentre os compostos antimicrobianos produzidos por BAL pode-se destacar os ácidos orgânicos (lático, cítrico, acético, fumárico e málico), peróxido de hidrogênio, gás carbônico, diacetil, etanol, reuterina, acetaldeído, acetoína, amônia e bacteriocinas (AGRIOPOULOU et al., 2020). Bacteriocinas são substâncias com estrutura proteica contendo cerca de 30 a 60 aminoácidos, também conhecidas como peptídeos antimicrobianos, com ação bactericida ou bacteriostática frente, principalmente, bactérias Gram-positivas. As bacteriocinas atuam na membrana citoplasmática bacteriana, interrompendo o movimento de prótons, causando a perda de íons, ATP, moléculas de RNA ou DNA e até morte celular dos micro-organismos alvo (AGRIOPOULOU et al., 2020).

Outro mecanismo de ação dos probióticos se dá por meio do aumento ou diminuição da atividade de algumas enzimas, como, por exemplo, da β -D-galactosidase, relacionada com a melhora de sintomas de intolerância à lactose (HILL et al., 2014). A produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato, também é outro efeito da ação de BAL no colón do hospedeiro (VALDES et al., 2018).

Devido a capacidade de adaptação a várias condições ambientais, as BAL são capazes de alterar seu metabolismo para secretar proteínas efetoras, produzir exopolissacarídeos, formar biofilmes ou aderir às superfícies bióticas ou abióticas. Por este motivo, podem ser encontradas em uma variedade de ambientes. Porém, a pressão seletiva exercida pelas condições ambientais tem efeito determinante na diversidade genômica entre cepas de BAL isoladas de diferentes fontes. Em geral, BAL selecionam *habitats* ricos em nutrientes, tais como frutas, grãos, leites, carnes e microbiomas de humanos e animais (DING et al., 2017; KAREB; AIDER, 2019). Nos vegetais, a presença de BAL representa uma parte considerável (2 a 4 log de UFC/g) de toda a população microbiana autóctone (5 a 7 log de UFC/g), sendo os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus* e *Pediococcus* os mais comumente identificados (DI CAGNO et al., 2013; FILANNINO et al., 2018).

Portanto, a microbiota de frutas pode ser considerada como adaptada as condições naturalmente encontradas nesses substratos, o que pode ser uma vantagem de adaptação natural à sobrevivência e multiplicação de BAL nesses ambientes e, possivelmente, quando inseridas em alimentos de origem vegetal. Ademais, estas características podem se assemelhar às aquelas encontradas no trato gastrointestinal humano, tais como a presença de fatores anti-nutricionais, como taninos e compostos fenólicos, além de baixos valores de pH. BAL isoladas de vegetais podem apresentar capacidade de sobrevivência na presença de sais biliares nas concentrações geralmente encontradas no intestino (0,3%), bem como melhor capacidade de adesão às células epiteliais intestinais (ROOBAB et al., 2020; SAMEDI; CHARLES, 2019).

Por serem amplamente utilizadas em produtos fermentados e como suplementos alimentares, as BAL têm sido caracterizadas de maneira detalhada em relação às suas características metabólicas e de crescimento, resistência a processos industriais e sobrevivência no produto final (SADRANI et al., 2014; SHEHATA et al., 2016). Algumas BAL podem ser consideradas possuidoras de propriedades probióticas, ou seja, promovem benefícios ao hospedeiro, particularmente, agindo na microbiota intestinal e estimulando respostas anti-inflamatórias e regulação energética (OLIVEIRA, 2009; RAJOKA et al., 2017). Para ser considerado como micro-organismo probiótico, a linhagem em estudo deve ser caracterizada de forma segura e seus efeitos benéficos sobre a saúde humana devem ser comprovados (ALFONZO et al., 2017; EFSA, 2012; HILL et al., 2014; MAMHOUD et al., 2016).

Órgãos especializados têm avaliado e delimitado a denominação e caracterização de micro-organismos como probióticos às seguintes recomendações:

- i) Realizar a identificação fenotípica e genotípica com a determinação de gênero e espécie da cepa e sua origem, com depósito em coleção internacional de culturas;
- ii) Avaliação de segurança, pois as cepas não podem ser patogênicas ou toxigênicas ou possuir plasmídeos de resistência a antibióticos e vírus, o que inclui testes de suscetibilidade a antibióticos, fatores de virulência, como produção de enzimas, por exemplo, atividade hemolítica e degradação da mucina;
- iii) Caracterização funcional (*in vitro* e em modelos animais), quando devem ser avaliados a resistência ao pH ácido e às enzimas digestivas, tolerância e hidrólise de sais biliares, capacidade de se multiplicar e aderir às células do epitélio intestinal. Esses ensaios podem ser realizados por meio de testes indiretos como hidrofobicidade da superfície celular, capacidade de autoagregação, coagregação com patógenos e atividade antagônica contra patógenos; e

iv) Devem ser avaliadas em relação aos atributos tecnológicos satisfatórios para a indústria de alimentos, tais como resistência aos processos industriais e contribuição para estabelecimento de sabor, textura e/ou aroma, por meio dos testes de avaliação da atividade proteolítica e lipolítica, tolerância ao NaCl, produção de exopolissacarídeos e diacetil (ALFONZO et al., 2017; ANVISA, 2019; EFSA, 2012; MAMHOUD et al., 2016; OLIVEIRA, 2009).

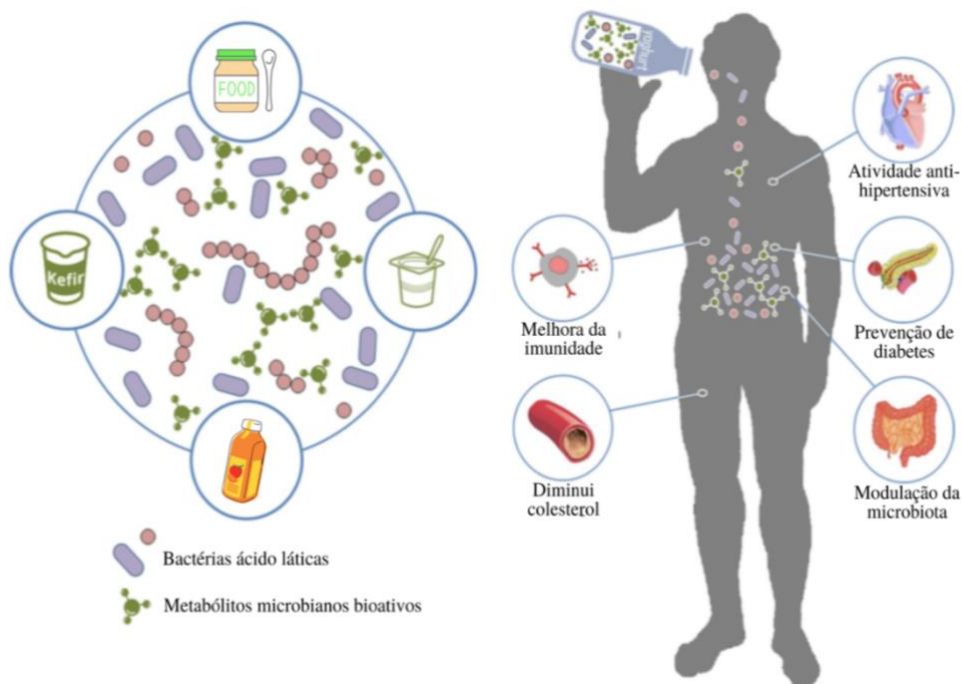
Portanto, são considerados candidatos para utilização pela indústria de alimentos na produção de alimentos funcionais, os micro-organismos probióticos que podem alterar o meio em que são inseridos pela produção de substâncias consideradas benéficas à saúde do hospedeiro, tais como proteção contra bactérias patogênicas, atividade antimicrobiana, neutralização de compostos indesejáveis, e que também possam promover alterações desejáveis em produtos alimentícios, bem como manutenção da sua vida de prateleira e atributos sensoriais (BEVILACQUA et al., 2019; GUERRA-ORDAZ et al., 2014).

2.2 BENEFÍCIOS DO CONSUMO DE PROBIÓTICOS

O interesse por alimentos que promovam redução do risco de doenças e melhorem aspectos de saúde tem corroborado consideravelmente com o crescimento de um nicho de mercado conhecido como alimentos funcionais. São classificados como tais, os alimentos que, além de fornecerem os benefícios básicos nutricionais, promovem saúde por meio de mecanismos não previstos na nutrição convencional, reduzindo o risco da ocorrência de doenças (DEVI et al., 2016; REID, 2016).

Os alimentos funcionais são classificados, de acordo com o composto bioativo que apresentam, em alimentos fontes de fibras, compostos fenólicos, ácidos graxos w-3, vitaminas e fitoquímicos, além de determinados peptídeos e proteínas e alimentos incorporados de probióticos (ANVISA, 2008; FAO/WHO, 2006; TERPOU et al., 2019). É sabido que probióticos são micro-organismos que, quando consumidos em quantidades adequadas e viáveis, conferem melhora na imunidade, redução nos níveis de colesterol sérico, efeitos anti-hipertensivos, prevenção de diabetes e equilíbrio na microbiota intestinal, como esquematizado na Figura 2 (FAO/WHO, 2006; GEORGE et al., 2018; LINARES et al., 2017; ROOBAB et al., 2020).

Figura 2 - Alimentos enriquecidos com bactérias probióticas e seus efeitos promotores de saúde.



FONTE: Adaptado de Linares et al. (2017).

O desequilíbrio da microbiota intestinal está envolvido na etiologia de diversas doenças. Vários estudos indicam que o consumo de probióticos contribui para manutenção da homeostase intestinal e, conseqüentemente, do sistema imunológico, pois, é nesta região do corpo onde se encontram o maior número de células do sistema imune. Na Figura 3 é apresentado um dos tecidos linfoides associados ao intestino ou GALT (*Gut-associated lymphoid tissue*) presentes na mucosa intestinal, onde encontram-se células linfoides inatas, cuja função principal é o reconhecimento de antígenos e ativação ou contenção da resposta inflamatória (LINARES et al., 2017).

Figura 3: Código QR para acessar vídeo da *Nature Immunology* com estruturas de células intestinais e mecanismo de ativação do sistema imunológico.

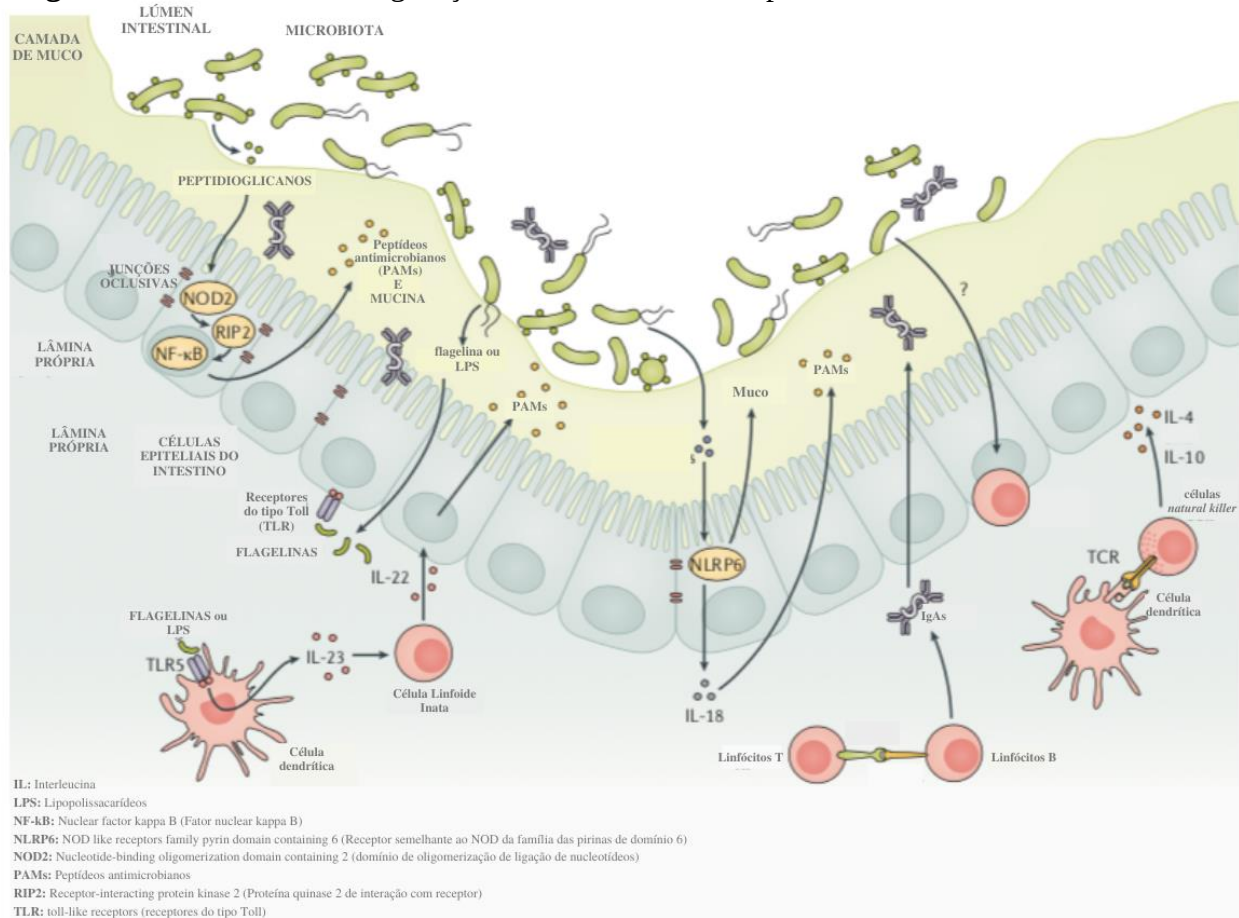


FONTE: NATURE VÍDEOS, 2020.

Conseqüentemente, os probióticos podem promover a manutenção da saúde ou reduzir risco de diversas patologias, tais como distúrbios gastrintestinais (RAJOKA et al., 2017; ROOBAB et al., 2020), doenças cardiovasculares, osteoporose (SAAD et al., 2011), câncer (DING, et al., 2017) e outras patologias (ROOBAB et al., 2020). Postula-se, que as propriedades benéficas dos probióticos podem ser mediadas pela ativação dos macrófagos, aumento dos níveis de citocinas e acréscimo da atividade das células *natural killer* (NK) e/ou dos níveis de imunoglobulinas. Cabe ressaltar, que esses efeitos exercidos pelos probióticos sobre a resposta imune ocorrem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial (LEVY et al., 2017).

Na Figura 4 é esquematizado o efeito positivo da presença de bactérias probióticas no lúmen intestinal, apresentando a camada de muco que contém mucina, peptídeos antimicrobianos e imunoglobulinas, representando a primeira barreira de defesa contra patógenos que resistem a acidez estomacal (LEVY et al., 2017; SAAD et al., 2011). Peptídeoglicanos presentes na membrana citoplasmática de bactérias probióticas, também conhecidos como MAMPs (Padrões moleculares associados a microrganismos), são reconhecidos pelas células do epitélio intestinal, que estimulam a secreção de proteínas e ativam a produção de peptídeos antimicrobianos e mucinas, repercutindo em equilíbrio do crescimento microbiano (LEVY et al., 2017). Os lipopolissacarídeos, também conhecidos como PAMPs (), que são componentes comuns em membranas citoplasmáticas de bactérias Gram-negativas, são reconhecidos por receptores do tipo *Toll*, os quais iniciam a ativação de uma sequência de enzimas envolvidas no processo inflamatório, na redução da ligação entre os enterócitos (junções oclusivas) e na maior permeabilidade intestinal a alérgenos e bactérias patogênicas ou oportunistas (SHEHATA et al., 2016).

Figura 4 - Mecanismo de regulação da imunidade inata pela microbiota.



FONTE: LEVY et al., 2017

Os efeitos benéficos provocados pelo consumo de alimentos probióticos são cepa-dependentes (GAUCHER et al., 2019). Alguns exemplos desta especificidade são citados a seguir: *Lactobacillus plantarum* CRL2130 e *Lactobacillus reuteri* ZJ03 foram capazes de produzir vitaminas B₂ e B₁₂ quando adicionados em extrato de soja (GU et al., 2015; LEVIT et al., 2016); *L. plantarum* YW11 produziu exopolissacarídeos (EPS) quando inseridos em *kefir*, os quais proporcionam propriedades anti-inflamatórias e modulam a microbiota (ROOBAB et al., 2020; WANG et al., 2015).

As propriedades de probióticos também têm sido relatadas como sendo dose-dependentes, ou seja, os efeitos na microbiota e saúde do hospedeiro dependem da quantidade ingerida. Todavia, de forma geral, tem sido sugerido que, para obter os efeitos esperados sobre a modulação da microbiota intestinal, há a necessidade de ingestão diária de 7 a 9 log de UFC de probióticos por grama ou mililitro de alimento para assegurar a sobrevivência durante o processo digestório. Ainda, tem sido proposto que aproximadamente 100 g/dia de produtos probióticos devem ser consumidos para fornecer, ao menos, 10⁹ células viáveis (LINARES et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019; TERPOU et al., 2019).

Os probióticos também podem induzir resistência aumentada contra patógenos por meio do estabelecimento da exclusão competitiva, que se caracteriza pelo impedimento de micro-organismos patogênicos colonizarem a mucosa intestinal. Tal efeito ocorre devido a competição por sítios de adesão e por nutrientes, bem como pela produção de compostos antimicrobianos por parte das cepas probióticas (AGRIOPOULOU et al., 2020; WORAPRAYOTE et al., 2016), o que impede a adesão dos patógenos e previne infecções e respostas inflamatórias indesejáveis (OLVEIRA; GONZÁLEZ-MOLERO, 2016).

Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente, butirato, propionato e acetato, são produtos da fermentação de bactérias probióticas e contribuem para manutenção do pH apropriado no cólon e supressão de patógenos. Ainda, promovem manutenção da saúde dos enterócitos e ativação e liberação de enzimas que degradam carcinógenos, o que ocorre em paralelo à supressão da produção de enzimas que sintetizam substâncias carcinogênicas (MAMHOUD et al., 2016; SHEHATA et al., 2016).

O butirato é considerado a principal fonte de energia dos colonócitos humanos e tem capacidade de induzir a apoptose das células cancerígenas no cólon, bem como de ativar a gliconeogênese intestinal (produção de glicose a partir de outros substratos). A glicose resultante deste processo ativa receptores do sistema nervoso periférico pela veia porta, repercutindo em efeitos benéficos na ingestão de alimentos e no metabolismo energético (DE VADDER et al., 2014; VALDES et al., 2018). O butirato também ativa a β -oxidação nos

enterócitos, levando ao consumo de oxigênio, o que favorece o estado de hipóxia no intestino grosso e contribui para o equilíbrio da microbiota presente nesse ambiente (BYNDLOSS et al., 2017; VALDES et al., 2018).

O propionato, por sua vez, é transferido para o fígado, onde regula a gliconeogênese hepática e sinalização da saciedade por meio da interação com os receptores intestinais de ácidos graxos (VALDES et al., 2018). O acetato, que é um metabólito essencial para o crescimento de outras bactérias, pode alcançar o fígado, onde é utilizado no metabolismo do colesterol e lipogênese. Ainda, pode desempenhar papel importante na regulação do apetite (VALDES et al., 2018).

O consumo de probióticos associados a ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota intestinal, denominados prebióticos, tem sido demonstrado como fator redutor da ocorrência de infecções respiratórias (SIMONE, 2019; SHEHATA et al., 2016). São estas substâncias que favorecem a produção de AGCC.

Os probióticos também estão positivamente envolvidos na redução dos níveis sanguíneos de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides. Os AGCC resultantes da fermentação de substratos por cepas probióticas provocam a diminuição dos níveis lipídicos sanguíneos por meio da inibição da síntese de colesterol hepático ou pela desconjugação dos sais biliares. Estes efeitos provocam maior excreção de ácidos biliares nas fezes, o que é compensada pela produção de novas moléculas de sais biliares a partir do colesterol captado do plasma (RAJOKA et al., 2017; SAAD et al., 2011; SHEHATA et al., 2016).

Similarmente, os probióticos contribuem para melhoria da saúde urogenital feminina, visto que esses micro-organismos podem alcançar e alterar favoravelmente a microbiota urogenital, prevenindo a ocorrência de infecções do trato urinário e genital, as quais são causadas, geralmente, por bactérias oriundas do cólon. Algumas características são consideradas importantes para a eficácia de probióticos para controlar estas infecções, tais como a capacidade de se estabelecer e proliferar no ambiente urogenital e produção de compostos antimicrobianos nos órgãos-alvos (REID, 2016; WORAPRAYOTE et al., 2016).

Produtos resultantes do metabolismo fermentativo de probióticos estão envolvidos na inibição da enzima de conversão da angiotensina I (ECA-I), e, portanto, podem contribuir para diminuição dos índices de hipertensão arterial sistêmica. Cepas de *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus* ou *Streptococcus thermophilus* têm sido relatadas como capazes de produzir peptídeos bioativos por meio da ação de enzimas proteolíticas, tais como Val-Pro-Pro

(VPP), Ile-Pro-Pro (IPP) e β -caseína-f, os quais regulam a pressão arterial sistêmica por meio da inibição de ECA-I (FERNENDEZ et al., 2015; LINARES et al., 2017).

Algumas BAL, como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* (atualmente denominadas de *Levilactobacillus brevis*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, respectivamente, conforme Zheng et al. (2020)) e *Lactobacillus helveticus* são produtoras da enzima glutamato descarboxilase envolvida na biossíntese de ácido gama-amino-butírico (GABA), o qual é importante neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central na indução da hipotensão em decorrência de seus efeitos diuréticos, relaxantes e anti-diabéticos (LINARES et al., 2017)

Recentemente, tem surgido interesse em relação ao papel que os probióticos podem exercer no eixo intestino-cérebro. Resultados de estudos apontam que a microbiota intestinal pode exercer efeito sobre os transtornos do humor e, por isso, o termo psicobióticos passou a ser utilizado para identificar cepas probióticas que podem causar benefícios à saúde mental (DINAN; CRYAN, 2017; LEVY et al., 2017).

Apesar de todos os efeitos listados e outros benefícios que ainda merecem maiores esclarecimentos, é imprescindível que se tenha cautela na seleção de cepas de probióticos. Tal cautela se baseia no fato de que esses micro-organismos podem apresentar efeitos adversos, a exemplo da produção de aminas biogênicas, que podem desencadear processos inflamatórios. Outro exemplo, são as cepas de probióticos portadoras de plasmídeos de resistência à antibióticos, os quais podem ser transmissíveis às bactérias patogênicas, podendo dificultar o tratamento de infecções (JAMES; WANG, 2019; RAJOKA et al., 2017). Portanto, é necessário se estabelecer a segurança na utilização de cepas probióticas antes que sejam lançados novos produtos, mesmo que estes micro-organismos sejam presumivelmente qualificados como seguros (QPS) (EFSA, 2012; RAJOKA et al., 2017). Porém, devido aos já bem estabelecidos benefícios à saúde dos consumidores, tem ocorrido aumento da demanda por alimentos probióticos, sobretudo, os probióticos não lácteos baseados em frutas e vegetais (JAMES; WANG, 2019).

2.3 USO DE PRODUTOS VEGETAIS PARA VEICULAÇÃO DE PROBIÓTICOS

Nos últimos anos, tem ocorrido um crescente interesse pela produção de alimentos probióticos não-lácteos, o que tem impulsionado a realização de pesquisas sobre a incorporação de probióticos em matrizes alimentares de origem vegetal, visto serem produtos com boa aceitação no mercado (DI CAGNO et al., 2013; FILANNINO et al., 2018). Dentre os principais fatores pelos quais decorrem este aumento de interesse, podem ser citados a crescente quantidade de pessoas com intolerância à lactose, ou alergia à proteína do leite de vaca, ou até por aversão a quantidade de colesterol que os produtos lácteos apresentam. Ainda, há razões culturais ou econômicas que também podem influenciar negativamente o consumo de produtos lácteos fermentados (FUJITA et al., 2017; SAAD et al., 2011).

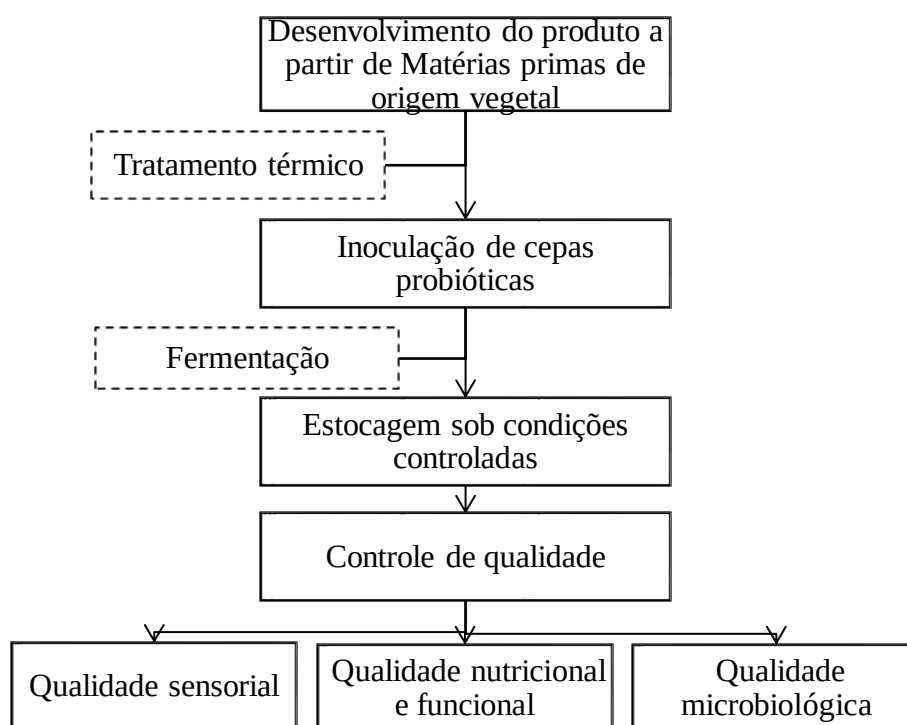
Por suas características de saudabilidade e bem-estar, os alimentos e bebidas à base de frutas, além de representarem um meio potencial para veiculação de probióticos, estão entre os alimentos de maior demanda de mercado nacional e internacional (ROOBAB et al., 2020). Dado que as frutas são fontes importantes de vitaminas, minerais, carotenoides e fibras, esses alimentos estão entre os componentes de uma dieta saudável e o seu consumo diário nas quantidades necessárias ao organismo contribui para a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis, consideradas uma das maiores causas de morte no mundo (DEVI et al., 2016; FUJITA et al., 2017; ROOBAB et al., 2020).

As frutas podem ser consideradas como fontes potenciais de micro-organismos com propriedades probióticas, tais como *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Weissella paramesenteroides* (ROOBAB et al., 2020). Essas bactérias, ao serem adicionadas em uma matriz alimentar, podem encontrar vários fatores de estresse, tais como temperaturas de refrigeração, pH ácido, aumento da concentração de certos íons, depleção de nutrientes e exposição ao estresse osmótico e/ou oxidativo (JAMES; WANG, 2019; TERPOU et al., 2019). Alguns autores têm relatado que cepas selecionadas de BAL possuem boa capacidade de adaptação e persistência em matrizes vegetais, o que é considerado um critério robusto para seleção de cepas candidatas para uso como probióticos (DI CAGNO et al., 2013; FILANNINO et al., 2018).

A produção de alimentos probióticos a base de frutas no Brasil apresenta alguns entraves. O primeiro diz respeito à legislação brasileira que não permite ainda a comercialização de sucos, néctares ou polpas fermentadas (SAAD et al., 2011). Outro aspecto de importância se relaciona às dificuldades de desenvolver bebidas adicionadas de probióticos sem, todavia, descaracterizar o produto inicial de forma considerável. Para tanto, é preciso que

o processo de desenvolvimento de alimentos probióticos, que pode ocorrer conforme fluxograma apresentado na Figura 5, garanta boa sobrevivência dos micro-organismos probióticos sem, contudo, haver produção de metabólitos em demasia de forma que venham a alterar as características previstas do alimento e sua aceitação pelos consumidores (SAAD et al., 2011; TERPOU et al., 2019).

Figura 5 - Fluxograma do desenvolvimento de alimentos probióticos a partir de alimentos de origem vegetal.

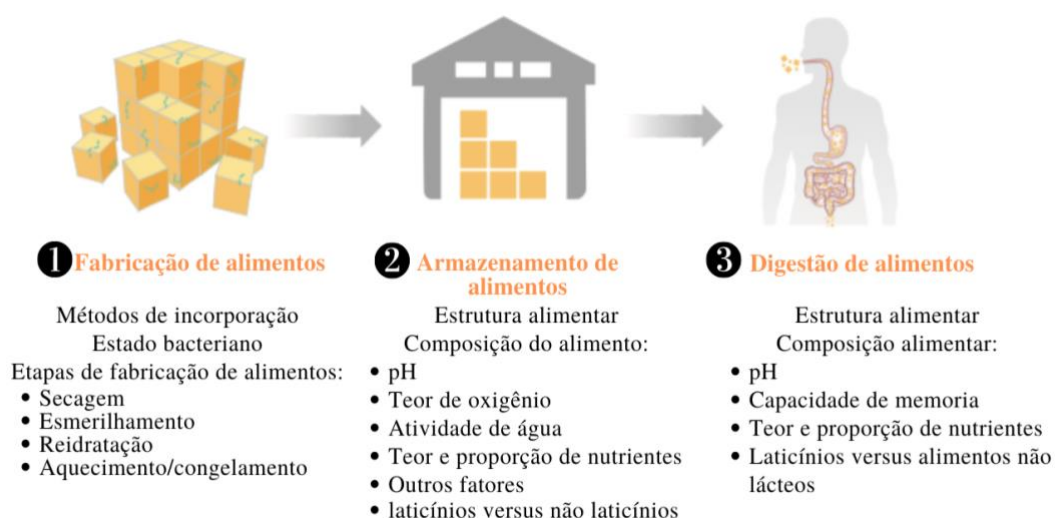


FONTE: Adaptado de Neffe-Skocinska et al. (2018).

O fato dos micro-organismos probióticos serem expostos a diversos tipos de estresses durante o processo de fabricação, que incluem estresse térmico, desidratação, agitação mecânica, estresse osmótico e oxidativo, pode resultar em perda da viabilidade e acarretar prejuízos quanto aos benefícios esperados. Porém, a tolerância de probióticos aos diferentes tipos de estresse tem sido mostrada ser cepa-dependente (CASSANI et al., 2020; GOMAND et al., 2019). Na Figura 6 são apresentados os principais fatores de estresse para cepas probióticas que estão envolvidos na produção de alimentos e que podem influenciar na sua viabilidade e funcionalidade.

O prejuízo à viabilidade das células de micro-organismos probióticos em alimentos pode ocorrer em vários momentos, desde a processo de fabricação do alimento, durante o armazenamento e durante o processo digestório (GOMAND et al., 2019). A secagem da cultura de micro-organismos probióticos por liofilização ou por *spray-drying* parece afetar menos a viabilidade das células quando comparada à inoculação de culturas congeladas (ENDO et al., 2014; IACONELLI et al., 2015).

Figura 6 - Fatores que interferem na viabilidade de cepas de probióticos em alimentos.



FONTE: Adaptado de Gomand et al. (2019).

Os processos envolvidos na produção de alimentos com as cepas já incorporadas também podem ter influência na manutenção da viabilidade celular, dentre os quais vale destacar o processo de secagem que é feito em frutas ou na transformação de sucos em pó. Ao passo, que a temperatura do ar e pressão atmosférica aumentam, há uma tendência de maior impacto sobre a viabilidade das células de BAL incorporadas no alimento (BARBOSA; TEIXEIRA, 2017). A exposição ao oxigênio pode causar mais danos a viabilidade do que os processos térmicos e de secagem (GOMAND et al., 2019).

A incorporação de BAL probióticas em alimentos pode ocorrer como culturas congeladas, secas, encapsuladas ou líquidas, embora a inoculação direta pareça ser a mais eficaz. A adaptação desses micro-organismos a matriz alimentar por meio de estresse subletal seguido por utilização de compostos crio-protetores e técnicas de microencapsulação também tem sido utilizada (ALFONZO et al., 2017; CASSANI et al., 2020; GOMAND et al., 2020;

MAMHOUD et al., 2016; SAARELA et al., 2016a; SAARELA et al., 2016b; VITALI et al., 2012)

Substâncias crio-protetoras são capazes de estabilizar as membranas celulares e evitar lesões, o que diminui a inativação celular nos processos de produção de alimentos que envolvem estresse mecânico. Por isso, alguns estudos têm demonstrado que cepas associadas a estas substâncias, quando liofilizadas, são capazes de manter maior número de células viáveis quando inoculadas em produtos de frutas submetidos ao estresse mecânico (GOMAND et al., 2019; SAMPAIO et al., 2021). Particularmente, a celulose presente nos vegetais tem mostrado boa capacidade crio-protetora de BAL (ARAÚJO et al., 2020; NEFFE-SKOCINSKA et al., 2018).

Altos teores de fibras também podem promover a adesão de BAL à matriz do alimento, aumentando assim sua sobrevivência durante o armazenamento. Alimentos sólidos e em géis permitem melhor sobrevivência das cepas de probióticos quando comparados aos alimentos com alta atividade de água, uma vez que a fixação das células de BAL nessas matrizes limita o acesso de fatores prejudiciais a sua manutenção, como ácidos orgânicos, oxigênio e outros. Matrizes sólidas também protegem as células de BAL de injúrias durante o processo de digestão e na passagem pelo estômago (GOMAND et al., 2019; SHORI, 2016).

O processo de reidratação de alimentos também pode oferecer impacto negativo nas contagens de bactérias viáveis quando o alimento reconstituído apresenta pH baixo e alta atividade de água (a exemplo de sucos de frutas em pó), pois essa condição favorece a migração de ácidos orgânicos e outros compostos bactericidas para o interior das células probióticas (GOMAND et al., 2019). O uso de temperaturas elevadas também é prejudicial, visto que cepas de BAL geralmente não conseguem sobreviver em temperaturas superiores a 65 °C por mais de um minuto. Por sua vez, temperaturas muito baixas reduzem a fluidez da membrana, a atividade enzimática e aumentam a sensibilidade a sais, o que pode causar danos na membrana citoplasmática (ENDO et al., 2014; GOMAND et al., 2019).

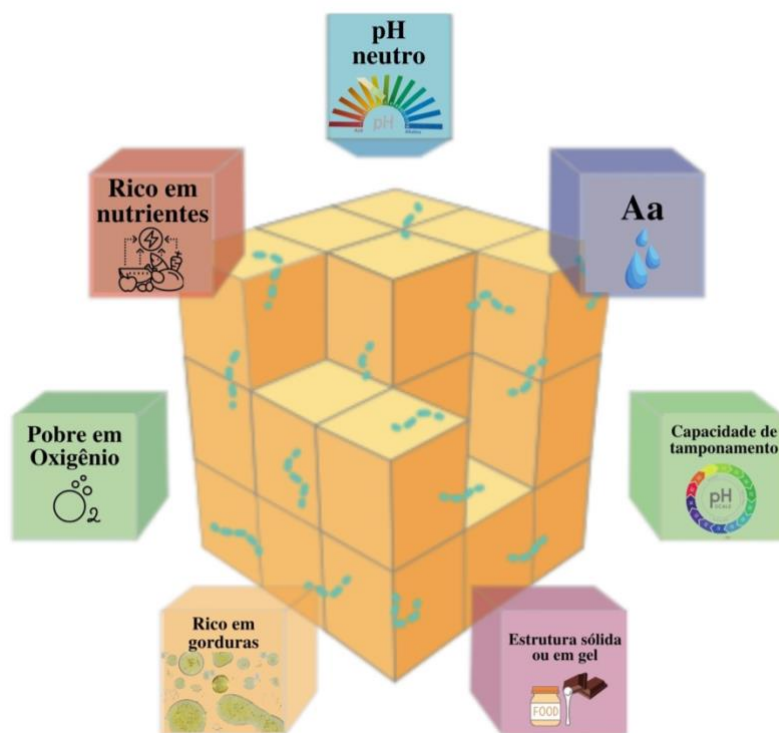
Outro problema encontrado pela indústria ao adicionar micro-organismos probióticos em alimentos, é que tais micro-organismos podem causar alteração no sabor e aroma do produto final devido a produção de metabólitos durante o armazenamento prolongado. Portanto, ao selecionar cepas de probióticos deve-se avaliar se a incorporação desses micro-organismos não irá afetar as características sensoriais e outras características de qualidade do produto (TERPOU et al., 2019).

As cepas probióticas também poderão ter a viabilidade e funcionalidade afetadas negativamente durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano. Por isso, estas cepas

precisam estar adaptadas a tais condições antes mesmo que ocorra a incorporação em matrizes vegetais (TERPOU et al., 2019). Durante a passagem pelo trato digestivo, micro-organismos probióticos são expostos a pH baixo, enzimas digestivas, sais biliares e movimentos peristálticos, que podem afetar negativamente a sua sobrevivência (CASSANI et al., 2020).

Pode-se presumir, portanto, que uma matriz ideal para produção de alimentos probióticos de origem vegetal (Figura 7) poderia apresentar pH mais próximo da neutralidade, boa capacidade de tamponamento, ser fonte de nutrientes, não permitir o acesso do oxigênio à superfície do alimento e, preferencialmente, apresentar estrutura sólida ou em gel (SHORI, 2016; GOMAND et al., 2019).

Figura 7 - Parâmetros considerados ideais para uma matriz alimentar carreadora de probióticos.



FONTE: Adaptado de Gomand et al. (2019).

BAL isoladas de matrizes vegetais têm apresentado boa capacidade de sobrevivência em condições simuladas do trato digestório e em matrizes alimentares que apresentam condições que não são consideradas ideais para manutenção da viabilidade de micro-organismos probióticos, como bebidas de frutas, que possuem, em geral, baixo pH, presença de ácidos orgânicos e estrutura fluida (DE ALBUQUERQUE et al., 2018; GARCIA et al., 2016). Os resultados destes estudos têm corroborado com a hipótese de que cepas isoladas de matrizes vegetais podem apresentar mecanismos de adaptação às condições adversas encontradas ao

longo do processo de digestão, do processamento e do armazenamento em alimentos que não possuem as condições consideradas adequadas para a manutenção da sobrevivência de probióticos (FILANNINO et al., 2018; GEORGE et al., 2018; KUMAR et al., 2015).

Para selecionar BAL que possuem os melhores atributos funcionais, bem como aquelas consideradas mais adequadas para incorporação em alimentos por apresentarem propriedades tecnológicas e boa capacidade de sobrevivência em matrizes alimentares que podem não ser consideradas ideais, é necessário que sejam feitas avaliações simultâneas de vários parâmetros. Para tanto, podem ser aplicadas técnicas quimiométricas de análise (NUNES et al., 2015; ROBERTS; COZZOLINO, 2016; TRUONG et al., 2019).

2.4 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS PARA SELEÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM PROPRIEDADES PROBIÓTICAS

A quimiometria vem sendo utilizada em estudos com micro-organismos probióticos para selecionar BAL com propriedades funcionais (NUNES et al., 2015; ROBERTS; COZZOLINO, 2016; TRUONG et al., 2019). A quimiometria é um termo utilizado para identificar as técnicas estatísticas e matemáticas aplicadas no desenho de experimentos e obtenção de resultados a partir de um grande volume de dados oriundos de análises químicas, sendo utilizadas ferramentas estatísticas de análises multivariadas (GRANATO et al., 2018).

As análises multivariadas envolvem análises de grande número de variáveis dependentes (resposta) e/ou independentes (preditores) e podem revelar características, correlações e interações entre alimentos e probióticos, as quais não poderiam ser observadas por meio de análises uni-variadas, tais como ANOVA e teste-t que são comumente utilizados em análises de alimentos (TRUONG et al., 2019).

Dentre os métodos quimiométricos utilizados na seleção de bactérias com atividade probiótica pode-se destacar a comparação de médias pelo uso do teste T^2 de *Hotelling* e análise de variância multivariada (MANOVA); os métodos de classificação conhecidos como análises de agrupamento ou cluster; os métodos de ordenação, como a análise de componentes principais (PCA) e análise de coordenadas principais (PCoA); e os métodos de correlação, como a regressão múltipla e análise de redundância (RDA) (GRANATO et al., 2018; TRUONG et al., 2019).

2.4.1 Comparação de médias

Para verificar se há diferenças significativas entre dois grupos ou duas amostras com duas ou mais variáveis utiliza-se o teste T^2 de *Hotelling* e a análise de variância multivariada (MANOVA). O teste T^2 de *Hotelling* é uma generalização do teste-t para dados univariados com vistas a avaliação de dados multivariados, sendo utilizado para comparar amostras de dados multivariados de dois grupos. Neste caso, as médias dos dados das amostras são convertidos em vetores e, ao invés de utilizar as variâncias das amostras, utiliza-se uma matriz de variância e covariância amostrais (GOTELLI; ELLISON, 2011; LEMAIRE et al., 2018; TOMASIK et al., 2015).

A MANOVA, por sua vez, é utilizada para comparar médias de dados multivariados de mais de dois grupos. Também é uma técnica similar à análise de variância (ANOVA) para dados univariados, com a diferença de que ao invés de comparar as médias dos grupos são comparados os centroides dos grupos (médias multivariadas). A correção de Bonferroni ou pós-teste é usada para fazer a comparação entre os grupos quando ocorre diferença significativa entre os mesmos (GOTELLI; ELLISON, 2011; KÜNG et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2014). No quadro 1 são citados alguns estudos utilizando as técnicas estatísticas de comparação de médias.

QUADRO 1 - Estudos que utilizaram comparação de médias na pesquisa com probióticos.

Técnica multivariada utilizada	Finalidade de aplicação no estudo	Referências
Teste T^2 de Hotelling	Verificação da diferença na microbiota e no metabolismo de grupos de porcos alimentados com lipídeos lácteos e vegetais.	LEMAIRE et al., 2018
	Comparação dos efeitos no sistema imunológico pelo uso de probióticos antes e após a suplementação.	TOMASIK et al., 2015
Análise de variância multivariada - MANOVA	Comparação das características de atividade antimicrobiana da microbiota de três grupos antes e após tratamento contra fungos de pele de anfíbios.	KÜNG et al., 2014
	Avaliação da aceitação de uma sobremesa de açaí suplementada com três diferentes cepas de probióticos e inulina.	VASCONCELOS et al., 2014.

2.4.2 Classificação

Classificação é o processo de agrupar amostras em classes similares, onde é possível identificar as semelhanças entre os indivíduos do mesmo grupo e as diferenças entre grupos diferentes. Os tipos de classificação são a análise de agrupamentos (*cluster analysis*) e a análise discriminante, que é o inverso das análises de agrupamento, e requerem a seleção e caracterização dos grupos de forma anterior à classificação (GOTELLI; ELLISON, 2011; CÂMARA et al., 2018; VENEGAS-ORTEGA et al., 2020)

As análises de agrupamento podem ser aglomerativas ou divisivas, hierárquicas ou não hierárquicas. As abordagens aglomerativas partem do princípio de que cada amostra está separada e, por meio de análise de similaridade, vão sendo aglomeradas em grupos distintos. As abordagens divisivas partem do princípio de que existe apenas um grupo de amostras que devem ser separadas em outros grupos por análise de dissimilaridade (CÂMARA et al., 2018).

Como regra geral, os métodos aglomerativos geram mais grupos que os métodos divisivos. Ambos os métodos também podem ser hierárquicos ou não. Os métodos hierárquicos utilizam fórmulas que adicionam as amostras aos grupos principais. Em contraste, os métodos não hierárquicos reúnem as observações sem depender de um sistema de referência imposto (GOTELLI; ELLISON, 2011; TOURET et al., 2018).

Na Tabela 2 são citados alguns estudos utilizando as técnicas estatísticas de classificação.

QUADRO 2 - Estudos que utilizaram classificação na pesquisa com probióticos,

Técnica multivariada utilizada	Finalidade de aplicação no estudo	Referências
Análise de agrupamentos	Seleção de cepas isoladas de queijo Pico por características tecnológicas para uso como culturas <i>starter</i> .	CÂMARA et al., 2018
	Seleção de cepas isoladas de queijo Chihuahua por meio da capacidade antimicrobiana e antioxidante.	VENEGAS-ORTEGA et al., 2020
	Seleção de cepas isoladas de chucrute com potencial probiótico por meio de características fenotípicas e genotípicas.	TOURET et al., 2018
	Classificação genética as bactérias lácticas isoladas de sementes fermentadas de pinheiro.	MISSAOUI et al., 2019

2.4.3 Ordenação

As técnicas de ordenação são conhecidas como estratégias de redução de dados, pois geram um número menor de variáveis a partir de um grande número de variáveis iniciais. As novas variáveis geradas são chamadas de fatores ou componentes, e, por meio das quais as amostras podem ser ordenadas (GOTELLI; ELLISON, 2011).

Dentre as técnicas de ordenação pode-se mencionar a análise de componentes principais (PCA), a qual é a técnica mais simples para ordenação de dados. Por meio dessa análise são criadas outras poucas variáveis, chamadas de componentes principais, a partir da combinação linear dos dados originais. Esses componentes principais descrevem, no máximo possível, a variação entre as amostras (GOTELLI; ELLISON, 2011; SOLIERI et al., 2014; SHARMA et al., 2017).

A análise fatorial, diferentemente da PCA, não cria novos componentes, mas baseia-se nos dados originais. Também é conhecida como PCA inversa (GOTELLI; ELLISON, 2011; BEVILACQUA et al., 2019; GUERRA-ORDAZ et al., 2014).

A análise de coordenadas principais (PCoA) é um método utilizado para ordenar amostras com variáveis categóricas, por exemplo, em estudos com dados de presença e ausência. De outra forma, a PCA e análise fatorial permitem a utilização de dados contínuos (GOTELLI; ELLISON, 2011; DASSI et al., 2018; LANG et al., 2014).

A análise de correspondência (CA), também conhecida como médias recíprocas (RA), é um caso especial de PCoA em que são examinadas as relações entre espécies e características do *habitat* (GOTELLI; ELLISON, 2011; BENÍTEZ-CABELLO et al., 2020; ANDERSON et al., 2013). O escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) tem como objetivo gerar um gráfico em que objetivos diferentes são posicionados em locais distantes no espaço de ordenação. E, diferentemente das outras técnicas de ordenação, não há necessidade de medidas específicas de distância (covariância), fazendo poucas suposições sobre os dados (GOTELLI; ELLISON, 2011; FOYSAL et al., 2020; LISKO et al., 2017).

Na Tabela 3 são mostrados alguns estudos com probióticos que utilizaram técnicas estatísticas de ordenação.

QUADRO 3 – Estudos que utilizaram ordenação na pesquisa com probióticos

Técnica multivariada utilizada	Finalidade de aplicação no estudo	Referências
Análise de Componentes Principais - PCA	Seleção de novas cepas probióticas isoladas de produtos lácteos fermentados e não fermentados a partir dos atributos funcionais.	SHARMA et al., 2017
	Seleção de cepas com potencial probiótico isoladas de queijo Parmigiano Reggiano.	SOLIERI et al., 2014
	Triagem das melhores cepas com potencial probiótico e tecnológico para preparação de bebida fermentada ayuverda.	CHOPADE et al., 2019
	Seleção do melhor perfil metabólico e lipídico de sucos fermentados por quatro diferentes cepas probióticas.	CHUNG et al., 2020
Análise fatorial - FA	Avaliação do efeito do tempo e das múltiplas interações na inclusão de produto simbiótico para melhora de quadros diarreicos em porcos.	GUERRA-ORDAZ et al., 2014
	Desenvolvimento de formulação de iogurte simbiótico.	BEVILACQUA et al., 2019
Análise de coordenadas principais - PCoA	Verificação dos grupos de bactérias predominantes na cavidade oral após o consumo de iogurte probiótico.	DASSI et al., 2018
	Verificação de grupos de bactérias predominantes nas refeições de três diferentes padrões alimentares.	LANG et al., 2014
Análise de Correspondência - CA	Elucidação da composição bacteriana nos biofilmes de diferentes amostras comerciais de azeitona de mesa utilizando abordagem metagenômica.	BENÍTEZ-CABELLO et al., 2020
	Verificação da capacidade de isolado bacteriano de origem oral de interferir na expressão gênica da proteção de barreira intestinal.	ANDERSON et al., 2013

Escalonamento multidimensional não métrico - NMDS	Avaliação da influenciada de suplementação ou não com duas cepas probióticas sobre a diversidade da microbiota em pescado.	FOYSAL et al., 2020
	Avaliação do efeito do consumo de iogurte sobre a composição e diversidade da microbiota intestinal de humanos saudáveis.	LISKO et al., 2017

2.4.4 Regressão múltipla multivariada

A análise de regressão múltipla multivariada é uma extensão da regressão, ou seja, uma variável resposta contínua é explicada por variáveis preditores contínuas. Neste caso, as respostas são multivariadas (GOTELLI; ELLISON, 2011).

A análise de redundância (RDA) é uma extensão direta da regressão múltipla para casos multivariados, onde existe uma relação de causa e efeito entre variáveis dependentes e independentes, a qual é demonstrada por meio de vários eixos diferentes que representam a relação (GUO et al., 2020; HORVATH et al., 2020). Na análise de correspondência canônica (CCA) é gerado um único eixo (eixo uni-modal) que explica a relação entre as variáveis. Essa técnica é geralmente utilizada para identificar a relação entre a ocorrência de gêneros e/ou espécies e as características do *habitat* (CASTANET et al., 2020; WANG et al., 2018)

Na Tabela 4 são mostrados alguns estudos que utilizaram as técnicas estatísticas de regressão múltipla variada.

QUADRO 4 – Estudos que utilizaram regressões múltiplas multivariadas em pesquisa com probióticos

Técnica multivariada utilizada	Finalidade de uso no estudo	Referências
Análise de redundância - RDA	Verificação da existência de relação entre a composição do microbioma e suplementação probiótica de pacientes cirróticos.	HORVATH et al., 2020
	Verificação da existência de relação entre as cepas isoladas do líquido ruminal e fezes de vacas leiteiras e parâmetros de qualidade da silagem utilizada como ração.	GUO et al., 2020
Análise de Correspondência canônica - CCA	Verificação da existência em recém-nascidos da relação entre diferentes padrões de fórmulas contendo probióticos e maturação intestinal verificada por diferentes marcadores.	CASTANET et al., 2020
	Verificação da ocorrência da relação entre a microbiota presente e produção de metabólitos na produção de licor chinês.	WANG et al., 2018

Dessa forma, verifica-se que o uso de técnicas quimiométricas tem sido bastante utilizadas em pesquisas que utilizam probióticos com propriedades funcionais. A aplicação dessas técnicas tem possibilitado avanços na forma de avaliar alimentos e na seleção de cepas

com propriedades probióticas, pois permitem que vários parâmetros possam ser testados simultaneamente, gerando novas aplicações e fornecendo novas ferramentas analíticas no desenvolvimento de parâmetros relacionados a qualidade de alimentos (TRUONG et al., 2019).

Sendo assim, as ferramentas quimiométricas para análise dos dados e tomada de decisão podem contribuir para o desenvolvimento de um protocolo para selecionar BAL com potencial probiótico, com atributos tecnológicos e com melhor capacidade de sobrevivência em diferentes alimentos seguindo as recomendações dos órgãos oficiais de regulamentação de alimentos com propriedades funcionais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

Amostras de frutas frescas, constituídas de bananas (*Musa* spp.), laranjas (*Citrus sinensis*), maçãs (*Malus domestica*) e uvas (*Vitis vinifera*), em estágio de maturação comercial, com ausência de sinais visíveis de infecção e danos mecânicos foram selecionadas. Estas foram adquiridas em diferentes momentos de coleta, conforme apresentado na Tabela 5. As coletas foram realizadas no período de novembro de 2017 a abril de 2018 em estabelecimentos comerciais localizados no município de João Pessoa (Paraíba, Brasil).

TABELA 1 - Coletas realizadas das amostras de frutas para isolamento de bactérias lácticas.

Data	Local	Número de coletas	Número de frutas coletadas			
			Maçã	Laranja	Uva	Banana
Novembro/2017	Carrefour Comercio e Indústria Ltda.	2	4	4	4	4
Dezembro/2017	Mercado Público de Jaguaribe	1	2	2	2	2
Janeiro/2018	Mercado Público Joaquim Torres	1	2	2	2	2
	Centro de Comercialização da Agricultura Familiar (CECAF)	1	2	2	2	2
Fevereiro/2018	Empresa paraibana de abastecimento (EMPASA)	2	3	3	3	3
	Feira Itinerante do Programa Cinturão Verde – Bessa	1	2	2	2	2
	Feira Itinerante do Programa Cinturão Verde – SEBRAE	1	1	1	1	1
Março/2018	Centro de Comercialização da Agricultura Familiar (CECAF)	2	1	1	1	1
	Feira Itinerante do Programa Cinturão Verde – SEBRAE	1	2	2	2	2
	Empresa paraibana de abastecimento (EMPASA)	1	4	4	4	4
Abril/2018	Feira Itinerante do Programa Cinturão Verde – SEBRAE	2	2	2	2	2
	Empresa paraibana de abastecimento (EMPASA)	1	2	2	2	2
Total		16	27	27	27	27
Total de frutas coletadas			108			

Todas as amostras foram coletadas assepticamente em sacos plásticos comercialmente esterilizados, acondicionados em caixas isotérmicas e transportados para o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos/Departamento de Nutrição/Centro de Ciências da Saúde/ Universidade Federal da Paraíba, onde foram armazenadas em temperatura de 10 ± 1 °C até o início da realização dos experimentos, o que ocorreu em período de, no máximo, 24 horas.

3.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS

As frutas foram lavadas com água destilada esterilizada, secas ao ar e em temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C). Talos e sementes foram descartados, e então, as frutas foram cortadas assepticamente em pequenos pedaços com uma faca de aço inoxidável em uma bandeja de vidro, sendo todos os materiais previamente esterilizados. Foram retiradas porções de 25 gramas de cada uma das frutas cortadas incluindo polpa e casca, e, em seguida, foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada esterilizada (0,1 g/100 mL, HiMedia, Mumbai, Índia) com uso de aparelho do tipo *Stomacher* (Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 5 minutos em temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C), com movimentos de 3000 x g /minuto (CHEN et al., 2017; VERÓN et al., 2017).

Cada amostra homogeneizada em água peptonada foi diluída em série ($1:9$; 10^{-2} – 10^{-5}) com água peptonada esterilizada. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi vertida em ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia) por meio da técnica de inoculação em superfície de placas, seguido de incubação sob condições de anaerobiose (Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, Reino Unido) a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas.

Após o período de incubação, pelo menos, cinco colônias com diferentes morfologias (encontradas nas duas diluições seriadas mais altas em cada placa de MRS contendo alíquotas das amostras de fruta) foram selecionadas aleatoriamente, rotuladas com código numérico, repicadas em ágar MRS e incubadas anaerobicamente (Anaerogen) a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas. Posteriormente, esses isolados foram mantidos em placas de ágar MRS sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C) (AMORIM et al., 2018; GARCIA et al., 2016). Foram isolados ± 540 colônias das amostras de frutas.

Os isolados foram inicialmente submetidos à análise de coloração de Gram, análise morfológica e teste de produção de catalase, realizados conforme procedimentos padrão descritos pela APHA (2015). 336 colônias que apresentaram resultados positivos para

coloração de Gram e negativos para o teste de produção de catalase foram ressuspensos em 5 mL de caldo MRS (HiMedia) e incubados a $37 \pm 0,5$ °C sob aerobiose durante 48 a 72 horas. Em seguida, alíquotas de 1 mL de caldo contendo as culturas dos isolados foram inseridas em criotubo contendo 0,15 mL de glicerol diluído (80 mL/100 mL, Sigma Aldrich, St. Louis, MA, EUA) e armazenados em temperatura de congelamento (-20 °C) (SADRANI et al., 2014; GARCIA et al., 2016).

3.3 IDENTIFICAÇÃO PRÉVIA DOS ISOLADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM IONIZAÇÃO POR DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ-TEMPO DE VOO

Os isolados identificados presuntivamente como BAL foram submetidos a análise de espectrometria de massa com tempo de voo com ionização de dessorção por laser assistida por matriz (MALDI-ToF MS). Aproximadamente, 20 colônias de cada isolado cultivado anaerobicamente (Anaerogen) em ágar MRS por 48 horas foram ressuspensas em 1,2 mL de etanol (75 mL/100 mL, Química Moderna, Barueri, São Paulo, Brasil). Após centrifugação ($14000 \times g$, 2 minutos, 4 °C) e remoção do sobrenadante, as proteínas foram extraídas com 50 µL de uma solução de acetonitrila: ácido fórmico: água (50:35:15 mL/100 mL) e misturados com uso de Vortex (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 1 minuto. Os sobrenadantes das amostras (1 µL) foram depositados em duplicata em poços de uma placa de amostra à temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C). Após secagem da placa, os poços contendo as amostras foram cobertos com 1 µL de solução saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL) e também com solução de acetonitrila:água:ácido trifluoroacético (50:47:3 mL/ 100 mL, Bruker Daltonics, Alemanha). As medições dos espectros de MALDI-ToF MS foram realizadas utilizando equipamento Bruker Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics). A calibração externa dos espectros de massa foi realizada com picos padrão alfa de *Escherichia coli* DH5.

Os perfis dos espectros de MALDI-ToF MS para identificação bacteriana foram então analisados com o software MALDI Biotyper TM 3.1 (Bruker Daltonics). Os resultados da identificação foram expressos em escores indicando a similaridade do perfil das amostras em MALDI-ToF MS com aqueles disponíveis no banco de dados da biblioteca de referência presente no software MALDI BiotyperTM 3.1. Os isolados com escores entre $\geq 2,3$ e $\leq 3,0$ indicaram identificação altamente provável da espécie; escores entre $\geq 2,0$ e $< 2,3$ indicaram identificação segura de gênero e provável identificação de espécies; escores entre $\geq 1,7$ e $< 2,0$

indicaram provável identificação de gênero; e escores entre $<1,7$ indicaram semelhança significativa entre o perfil do isolado avaliado e as entradas contidas no banco de dados (AMORIM et al., 2018; GARCIA et al., 2016).

3.4 TESTES DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DOS ISOLADOS

3.4.1 Testes de segurança

3.4.1.1 Atividade hemolítica

Uma alíquota de 10 μ L da cultura de cada isolado cultivado anaerobicamente (Anaerogen) em caldo MRS por 24-48 horas à 37 °C foi vertida em ágar sangue preparado com ágar Mueller Hinton (Acumedia, Baltimore, MA, EUA) e sangue humano (5 mL/100 mL), seguindo-se por incubação sob anaerobiose (Anaerogen) a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas. Ao final do período de incubação, as placas de ágar sangue foram examinadas quanto à presença de β -hemólise (zonas claras ao redor das colônias), α -hemólise (zonas verdes ao redor das colônias) ou γ -hemólise (sem zonas ao redor das colônias). A produção de β -hemólise caracterizou atividade hemolítica positiva (SANTINI et al., 2010).

3.4.1.2 Atividade mucinolítica

Uma alíquota de mucina gástrica porcina tipo III parcialmente purificada (0,5 g/100 mL, Sigma-Aldrich) foi incorporada em ágar bacteriológico (1,2 g/100 mL, HiMedia) com ou sem glicose (3 g/100 mL, Sigma-Aldrich). Alíquotas de 10 μ L da cultura de cada isolado cultivado em caldo MRS anaerobicamente (Anaerogen) a $37 \pm 0,5$ °C por 24 horas foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar bacteriológico, mucina gástrica e glicose, bem como em placas com o mesmo ágar sem glicose, seguindo-se por incubação anaeróbica (Anaerogen) por 72 horas a $37 \pm 0,5$ °C.

Ao final do período de incubação, todas as placas foram coradas com amido preto (0,1 g/100mL, Sigma-Aldrich) solubilizado em ácido acético 3,5 M (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 30 minutos e lavadas com ácido acético 1,2 M (Merck). A presença de uma zona clara ao redor das colônias foi considerada indicadora de atividade mucinolítica (MONTEAGUDO-MERA et al., 2012).

3.4.1.3 Atividade da gelatinase

A atividade da gelatinase foi avaliada com utilização de ágar de gelatina formulado com gelatina (3 g/100 mL, HiMedia), peptona (0,5 g/100 mL, HiMedia), extrato de levedura (0,3 g/100 mL, HiMedia) e ágar bacteriológico (1,7 g/100 mL, HiMedia). Uma alíquota de 10 µL da cultura de cada isolado cultivado em caldo MRS (HiMedia) por 24 horas a $37 \pm 0,5$ °C sob anaerobiose (Anaerogen) foi inoculada em ágar de gelatina e incubada anaerobicamente (Anaerogen) a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas. Ao final do período de incubação, as placas foram lavadas com solução de sulfato de amônio saturado (Merck) e a presença de zonas claras ao redor das colônias foi considerada indicativa de atividade de gelatinase (DOMINGOS-LOPES et al., 2017).

3.4.1.4 Atividade da DNase

Uma alíquota de 100 µL da cultura de cada isolado cultivado em caldo MRS (HiMedia) por 24 horas a $37 \pm 0,5$ °C sob condições de anaerobiose (Anaerogen) foi inoculada em ágar DNase (Sigma-Aldrich), e incubada sob anaerobiose (Anaerogen) a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas. Ao final do período de incubação, as placas foram lavadas com ácido clorídrico (HCl) 1N (Merck) e a presença de uma zona rosa clara ao redor das colônias foi indicativo de atividade de DNase (DOMINGOS-LOPES et al., 2017).

3.4.1.5 Produção de aminas biogênicas

A produção de aminas biogênicas foi examinada através de meio de cultura elaborado com triptona (0,5 g/mL, Himedia), extrato de levedura (0,5 g/mL, Himedia), NaCl (0,5 g/mL, Merck), glicose (0,1 g/mL, Sigma-Aldrich), Tween 80 (0,05 g/mL, Merck), sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,02 g/mL, Merck), carbonato de cálcio (0,01 g/mL, Merck), púrpura de bromocresol (0,006 g/mL, Sigma-Aldrich), sulfato de manganês tetra-hidratado (0,005 g/mL, Merck), sulfato de ferro hepta-hidratado (0,004 g/mL, Merck) e ágar bacteriológico (2 g/mL, HiMedia). Também foi adicionado o aminoácido precursor da amina biogênica (2 g/100 mL, Sigma-Aldrich) na formulação do ágar, a saber:

- L-histidina: precursor da histamina; ou
- L-lisina: precursor de cadaverina.

O pH do meio foi ajustado para 5 com HC1 IN (Merck). Então, uma alíquota de 10 µL da cultura de cada isolado cultivado em caldo MRS por 24 horas a $37 \pm 0,5$ °C sob condições de anaerobiose (Anaerogen) foi inoculada em placas de Petri contendo o ágar elaborado com o aminoácido precursor de amina biogênica. Após incubação durante 72 horas a $37 \pm 0,5$ °C sob anaerobiose (Anaerogen), a alteração na cor do ágar de verde para roxo, como resultado do aumento do pH devido à descarboxilação do aminoácido, foi indicativa de produção de aminas biogênicas (DOMINGOS-LOPES et al. 2017).

3.4.1.6 Sensibilidade a antibióticos

Os isolados que foram selecionados por meio das ferramentas estatísticas, descritas no item 3.8, que levou em consideração as propriedades probióticas e tecnológicas *in vitro*, foram examinados quanto à sensibilidade a antibióticos utilizando método padrão de difusão em disco (AWASTI et al., 2016). Os antibióticos testados e suas concentrações em disco estão descritos na Tabela 6.

TABELA 2 - Antibióticos* utilizados e suas concentrações em disco.

Antibiótico	Concentração em disco
Ampicilina	10 µg
Cloranfenicol	30 µg
Eritromicina	15 µg
Clindamicina	2 µg
Tetraciclina	30 µg
Vancomicina	30 µg
Gentamicina	10 µg
Tobramicina	10 µg
Estreptomicina	300 µg

*Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido

Os isolados foram cultivados anaerobicamente (Anaerogen) em caldo MRS (HiMedia) por 24 horas a $37 \pm 0,5$ °C e submetidos a centrifugação (4000 x g, 15 minutos, 4 °C). Em seguida, foram lavados duas vezes com STF por meio de centrifugação e, subsequentemente, ressuspensos em caldo Mueller Hinton (Acumedia), para obtenção de densidade óptica (DO) a 600 nm ajustada para 0,5., correspondendo a contagem de 7 log de UFC/g ou mL.

Uma alíquota de 100 µL da suspensão de cada isolado foi espalhada sobre a superfície do ágar Mueller Hinton (Acumedia) em Placa de Petri. Os discos de papel de filtro impregnados com cada antibiótico (Oxoid), isoladamente, foram inseridos nas superfícies do ágar Mueller Hinton com auxílio de pinça estéril após completa absorção da placa. Estas placas foram incubadas a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas sob anaerobiose (Anaerogen). Ao final do período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição de crescimento foram mensurados com auxílio de paquímetro. A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle. Os isolados foram classificados como suscetível (S) ou resistente (R) com base na medida do diâmetro dos halos de inibição para cada antibiótico testado de acordo com a Tabela 7 (para *Lactobacillus* sp.) (CHARTERIS et al., 1998; CLSI, 2012; HANA et al., 2015)

TABELA 3 – Critérios de avaliação da suscetibilidade a antibióticos de acordo com o diâmetro da zona de inibição do crescimento.

Antibiótico	Resistente*	Suscetível moderadamente	Suscetível*
Ampicilina	≤12	13 – 15	>15
Cloranfenicol	≤12	14 – 17	≥18
Eritromicina	≤13	14 – 17	≥18
Clindamicina	≤8	9 – 11	≥12
Tetraciclina	≤14	15 – 18	≥19
Vancomicina	≤14	15 – 16	≥17
Gentamicina	≤12	–	≥13
Tobramicina	≤13	14 – 17	≥18
Estreptomicina	≤11	12 – 14	≥15

* Medida em milímetros da zona clara (halo) ao redor do disco impregnado de antibiótico

3.4.2 Testes de potencial tecnológico

3.4.2.1 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi avaliada após os isolados terem sido cultivados em caldo MRS (HiMedia) por 24 horas a $37 \pm 0,5$ °C sob anaerobiose (Anaerogen). Uma alíquota de 10 µL destas culturas foi inoculada, com o uso de técnica de micro-gota, em placas de Petri contendo ágar contagem padrão em placas (HiMedia) suplementado com leite desnatado sem lactose (10 g/100 mL, Camponesa, Lagoa da Prata, Minas Gerais, Brasil), o qual foi adicionado ao ágar após ter sido autoclavado (121 °C por 15 minutos, 1 atm). As placas foram incubadas sob anaerobiose (Anaerogen) a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas. Ao final do período de incubação, a

presença de uma zona clara ao redor das colônias após lavagem com HCl (1N, Merck) foi indicativo de atividade proteolítica (DOMINGOS-LOPES et al., 2017).

3.4.2.2 *Produção de diacetil*

Os isolados foram cultivados anaerobicamente (Anaerogen) em caldo MRS por 24 horas a 37 °C e, em seguida, foram submetidos a centrifugação (4000 x *g*, 15 minutos, 4 °C). Com a utilização de uma solução de tampão de fosfato (Himedia) esterilizada com pH ajustado para 7,2, o sedimento da cultura foi lavado e ressuspensionado em 1 mL dessa solução, sendo a DO a 600 nm da suspensão ajustada para 1, correspondendo a contagem de 9 log de UFC/g ou mL. Uma alíquota de 10 µL da suspensão do isolado foi inoculada em 5 mL de leite UHT (Camponesa) contendo 0,5 mL de α -naftol (Sigma Aldrich) e 0,8 g de hidróxido de potássio (KOH) (Sigma Aldrich), seguindo-se por incubação a $37 \pm 0,5$ °C durante 10 minutos. A formação de um anel vermelho no topo do tubo foi indicativa da produção de diacetil (DE ALBUQUERQUE et al., 2017).

3.4.2.3 *Produção de exopolissacarídeos*

Os isolados foram cultivados anaerobicamente (Anaerogen) em 5 mL de caldo MRS (HiMedia) adicionado de glicose (2 g/100 mL, Himedia) durante 72 horas a $37 \pm 0,5$ °C. Em seguida, as culturas foram lavadas com STF por meio de centrifugadas (6000 x *g*, 20 minutos, 4 °C). Posteriormente, foi adicionado a 1 mL do sobrenadante do produto da centrifugação, 2 mL de etanol mantido sob refrigeração (95 mL/100 mL, Química Moderna), homogeneizados com Vortex (Tecnal) e mantidos a 4 °C por 24 horas para induzir a precipitação de exopolissacarídeos. Os precipitados foram recolhidos por meio de centrifugação (2000 x *g*, 15 minutos, 4 °C) e lavados com água destilada esterilizada. Após esse processo, os grânulos foram secos a 55 ± 1 °C até peso constante e a quantidade de exopolissacarídeos produzida foi determinada medindo o peso seco, o qual foi expresso em mg/L (BUJNAKOVA; STRAKOVA, 2017).

3.4.2.4 Tolerância a diferentes concentrações de NaCl

Alíquotas de 10 µL dos isolados foram cultivadas anaerobicamente (Anaerogen) em 5 mL de caldo MRS (Himedia) durante 48 horas a $37 \pm 0,5$ °C. Após esse período, 100 µL de cada cultura foi transferida para tubos contendo 10 mL de caldo MRS com as seguintes concentrações de cloreto de sódio (NaCl, Merck), seguindo-se por incubação a $37 \pm 0,5$ °C por 24 horas sob anaerobiose:

- Caldo MRS com 2 g/100 mL NaCl;
- Caldo MRS com 4 g/100 mL de NaCl;
- Caldo MRS com 8 g/100 mL de NaCl;
- Controle com caldo MRS sem adição de NaCl.

Ao final do período de incubação, alíquotas de 1 mL de cada cultura foram diluídas em série em água peptonada (Himedia) esterilizada ($1: 9$, 10^{-1} a 10^{-5}). Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar MRS por meio da técnica de inoculação em superfície de placas. Após incubação anaeróbica (Anaerogen) de 48 horas a $37 \pm 0,5$ °C, as colônias visíveis foram contadas. Os resultados foram expressos como porcentagem das taxas de sobrevivência, ou seja, a diferença entre as contagens de células viáveis encontradas no caldo MRS com a concentração de NaCl testada e as contagens encontradas no caldo MRS sem NaCl (controle). O limite de detecção desses ensaios foi de 2 log UFC/mL (DE ALBUQUERQUE et al., 2017).

3.4.2.5 Capacidade de acidificação

Alíquotas de 10 µL das suspensões dos isolados foram cultivados anaerobicamente (Anaerogen) em 5 mL de caldo MRS (HiMedia) durante 24 horas a $37 \pm 0,5$ °C. Após esse período, a DO 600 nm foi ajustada para 1, correspondendo a contagem de 9 log de UFC/g ou mL, e 100 µL de cada cultura foi inoculada em 10 mL de caldo MRS (HiMedia) com pH ajustado para 7,2, seguindo-se por incubação sob condições de anaerobicose (Anaerogen) a $37 \pm 0,5$ °C. O pH do meio foi medido no tempo zero (logo após a inoculação) e após 24 horas de incubação com um medidor de pH (Jenco Electronics, San Diego, CA, EUA). A capacidade de acidificação foi determinada pela diferença entre o pH do meio após 24 horas de incubação e o valor de pH do meio no tempo zero do período de incubação (BUJNAKOVA; STRAKOVA, 2017).

3.4.3 Testes de potenciais efeitos fisiológicos *in vitro*

3.4.3.1 Tolerância a meio ácido e a concentrações de sais de bile

A tolerância à diferentes valores de pH e concentrações de sais biliares foi medida por meio da inoculação de uma alíquota de 1 mL da suspensão de crescimento de cada isolado incubada durante 18 a 24 horas para alcance de contagens de células viáveis de aproximadamente 7 log de unidades formadoras de colônias por mL (log UFC/mL). Caldos com crescimento visível tiveram o inóculo ajustado para DO a 600 nm de 0,5, o que correspondeu a cerca de 6 a 7 log de UFC/mL. Estes foram centrifugados (7000 x g, 10 minutos, 4 °C) e o sedimentos lavado duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (STF). Alíquotas de 1 mL de cada suspensão de células foi inoculada em 9 mL de soluções tampão de fosfato esterilizada (HiMedia), nas seguintes condições:

- com pH ajustado para 7,2;
- com pH ajustado para 3;
- com pH ajustado para 2;
- com pH ajustado para 7,2 e adicionadas de sais biliares (0,5 g/100 mL, Sigma-Aldrich).

Para o ajuste do pH foi utilizado HCl 1N (Merck) ou NaOH 2N (Merck). Em diferentes intervalos de tempo (1, 2, 3, 4 e 6 horas) a 37 °C com agitação de 150 rpm, foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada solução, a qual foi diluída em série em água peptona esterilizada (1: 9, 10^{-1} - 10^{-5}), então uma alíquota de 100 µL inoculada em ágar MRS (HiMedia) pela técnica de plaqueamento em superfície. Após um período de incubação anaeróbica (Anaerogen) por 48 horas a 37 °C, as colônias visíveis foram contadas e os resultados foram expressos em log de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). As contagens obtidas na solução tampão fosfato com pH 7,2 e sem adição de sais biliares foram utilizadas como controle (MONTEAGUDO-MERA et al., 2012). Nesses ensaios foi utilizado limite de detecção de 2 log de UFC/mL.

3.4.3.2 Desconjugação de sais biliares

Uma alíquota de 10 µL da suspensão de cada isolado cultivado anaerobicamente (Anaerogen) em caldo MRS (HiMedia) durante 20 - 24 horas a $37 \pm 0,5$ °C foi inoculada, por

meio da técnica de inoculação em superfície de placas, em ágar MRS (HiMedia) contendo ácido taurodesoxicólico (0,5g/100 mL, Sigma-Aldrich) ou ácido glicodeoxicólico (Sigma-Aldrich) e incubados anaerobicamente (Anaerogen) a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas. O aparecimento de uma zona opaca ao redor das colônias foi indicativa de desconjugação de sais biliares (SANTOS et al., 2014).

3.4.3.3 Hidrofobicidade da superfície celular

Os isolados foram cultivados anaerobicamente (Anaerogen) em caldo MRS (HiMedia) por 20 a 24 horas a $37 \pm 0,5$ °C, e, em seguida, foram submetidos à centrifugação ($7000 \times g$, 10 minutos, 4 °C). Foram realizadas duas lavagens seguidas das células com uso de solução tampão de fosfato (Himedia) esterilizada com pH ajustado para 7,2. Posteriormente, as células foram ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (STF) com ajuste de DO a 600 nm para 0,5, correspondendo a contagem de células viáveis entre 6 e 7 log de UFC/g ou mL, denominando-o de H_0 .

O solvente orgânico N-hexadecano (Sigma-Aldrich) foi adicionado na proporção de 1:5 a suspensão de células, seguindo-se por agitação com utilização de Vortex por 2 minutos e foi incubado por 1 hora a 37 °C. Logo após, foi mensurada a DO_{600nm} da camada aquosa que se formou durante o período de repouso, ao qual foi denominado valor de H.

A taxa de hidrofobicidade da superfície celular (%H) foi calculada com o uso da fórmula:

$$\%H = [1 - (H \div H_0)] \times 100$$

Onde H_0 e H se referem aos valores da DO_{600nm} determinados antes e após a extração com N-hexadecano, respectivamente (SANTOS et al., 2014).

3.4.3.4 Autoagregação

Os isolados foram cultivados anaerobicamente (Anaerogen) em caldo MRS por 20 a 24 horas a 37 °C e, em seguida, cada cultura foi submetida a centrifugação ($7000 \times g$, 5 minutos, 4 °C). Com uso de solução tampão de fosfato (Himedia) esterilizada com pH ajustado para 7,2, lavou-se duas vezes as células e, posteriormente, foi realizada a ressuspensão das células em STF, sendo ajustada a DO a 600nm para 0,5, correspondendo a contagem de células viáveis

entre 6 e 7 log de UFC/g ou mL, denominando-a de A_0 . O sistema foi incubado por 1 hora a 37 °C, e, logo após, foi mensurada a DO_{600} novamente, denominando-a de A .

A autoagregação (%A) foi determinada por meio da equação:

$$\%A = [1 - (A \div A_0)] \times 100$$

Onde A_0 se refere ao valor inicial da densidade ótica, e A se refere ao valor da densidade ótica determinado após uma hora de incubação (TODOROV et al., 2008).

3.4.3.5 Antagonismo frente bactérias patogênicas

Os isolados que foram selecionados por meio das ferramentas estatísticas, descritas no item 3.6, que levou em consideração as propriedades tecnológicas e probióticas *in vitro*, e que, em seguida, foram examinados quanto à suscetibilidade a antibióticos, foram, finalmente, submetidos ao teste de avaliação da atividade antagônica frente bactérias patogênicas por meio da técnica de *spot* ágar (GARCIA et al., 2016; TOURET et al., 2018). Os isolados foram cultivados anaerobicamente (Anaerogen) em caldo MRS (HiMedia) por 20 a 24 horas a 37 °C, e, após centrifugação (7000 x *g*, 10 minutos, 4 °C), o sedimento foi lavado duas vezes com STF, a DO a 600 nm da cultura foi ajustada para 0,5, o que corresponde aproximadamente a 7 log UFC/mL. Uma alíquota de 10 µL de cada suspensão dos isolados foi depositada, pela técnica de micro-gota, em ágar MRS contendo glicose (0,2 g/100 mL, Himedia) e ágar bacteriológico (1,2 g/100 mL, Himedia), seguindo-se por incubação sob anaerobiose (Anaerogen) por 24 horas a $37 \pm 0,5$ °C.

As bactérias indicadoras utilizadas no teste foram *Listeria monocytogenes* (INCQS 00266, origem ATCC 7644) e *Escherichia coli* (INCQS 00219, origem ATCC 8739), sendo obtidas da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil). Estes isolados foram inoculados em caldo *brain-heart-infusion* (BHI, Himedia) por 20 a 24 horas a 37 °C. Após centrifugação (7000 x *g*, 10 minutos, 4 °C), o sedimento foi lavado duas vezes com STF, a DO a 600 nm do inóculo foi ajustada para 0,1, correspondendo aproximadamente a 8 log UFC/mL. Em seguida, alíquotas de cada suspensão bacteriana indicadora foram então misturadas com 18 mL de ágar BHI semi-sólido preparado com 0,7 g/100 mL de ágar bacteriológico, a fim de obter contagens totais de aproximadamente 5 log de UFC/mL. Esse meio foi vertido sobre o ágar MRS inoculado com os isolados selecionados. As placas foram incubadas aerobicamente a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas, e, ao final do período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição de crescimento foram medidos. A ocorrência de

atividade antagônica foi considerada positiva quando o diâmetro das zonas de inibição de crescimento ao redor de cada ponto de inoculação dos isolados foi maior que 1 mm. Placas contendo ágar MRS não inoculado com os isolados de BAL foi utilizado como controle negativo nesses ensaios.

3.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS SELECIONADOS

A identificação molecular dos isolados foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. A extração de DNA foi realizada utilizando-se a técnica de *beads* magnéticas com protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). O DNA foi quantificado utilizando-se fluorímetro Qubit, com o kit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, EUA). Após quantificação, o DNA foi diluído a 0,5 ng/μL. O preparo das bibliotecas seguiu o protocolo descrito pela Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para região V3/V4 do gene rRNA 16S, 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG, WANG; QIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, CAPORASO et al., 2012).

As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*. As sequências foram analisadas por meio de um *pipeline* utilizado pela Neopropecta Microbiome Technologies. Resumidamente, todas as sequências de DNA resultantes do sequenciamento passaram individualmente por um filtro de qualidade utilizando como base o somatório das probabilidades de erro de suas bases, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. Posteriormente, foram removidas as sequências de DNA correspondentes aos adaptadores da tecnologia Illumina. As sequências que passaram pelos procedimentos iniciais e que tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/*clusters* e foram utilizadas para identificação taxonômica por comparação com banco de dados de sequências acuradas de 16S rRNA (NeoRef, Neopropecta Microbiome Technologies). A identificação bacteriana foi assumida quando a sequência de consulta tinha >99% de similaridade com a sequência do gene 16S rRNA. Procedeu-se o depósito na base de dados pública GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.6 SELEÇÃO DOS ISOLADOS MAIS PROMISSORES PARA USO COMO PROBIÓTICOS

3.6.1 Primeira seleção

Os resultados dos experimentos para avaliar a atividade de DNase, gelatinase, atividade mucinolítica e hemolítica e produção de duas aminas biogênicas foram considerados como critérios de exclusão dos isolados de BAL. Assim, os isolados com atividade positiva para DNase, gelatinase, atividade mucinolítica e hemolítica e produção de histamina ou cadaverina não foram incluídos nos testes subsequentes de seleção.

Os resultados de atividade proteolítica, produção de diacetil, produção de expopolissacarídeos, capacidade de acidificação e tolerância ao NaCl foram classificados em quartis e, em seguida, convertidos em códigos qualitativos conforme mostrado na Tabela 8. Esses resultados foram utilizados para executar a análise de agrupamentos do tipo hierárquica com objetivo de dividir os isolados em grupos homogêneos por meio de uma abordagem de similaridade.

As amostras com resultados de produção de EPS e tolerância a NaCl localizados no primeiro quartil receberam código zero. Aquelas com resultados que ficaram no segundo e terceiro quartil receberam o código um. Enquanto os isolados que foram agrupados no último quartil receberam o código dois. Os resultados de capacidade de acidificação receberam código zero quando a redução de pH foi menor que um, e código um quando a redução de pH estava entre um e 1,5 e, quando a redução do pH foi maior que 1,5 receberam o código 2. Para BAL com resultados de produção de diacetil e atividade proteolítica, que são variáveis qualitativas, receberam código zero para ausência de atividade e código 1 para presença de atividade (ESPERANZA et al., 2017).

A análise de cluster foi feita com o software RStudio (R CORE TEAM, 2019). Todas as análises para avaliar segurança (atividade hemolítica e mucinolítica, produção de gelatinase, de DNase e de aminas biogênicas), de potencial tecnológico (atividade proteolítica, produção de diacetil e de EPS, tolerância a diferentes concentrações de NaCl e capacidade de acidificação) foram realizadas em triplicata em três ensaios independentes.

TABELA 4 - Códigos qualitativos utilizados para análises multivariadas.

Código	Atividade proteolítica	Produção de diacetil	Produção de EPS e Tolerância ao NaCl	Capacidade de acidificação	Testes de potencial efeito fisiológico
0	Ausente	Nenhum	<25%	<1	<25%
1	Presente	Fraco	25-75%	1 – 1.5	25-75%
2		Forte	>75%	>1,5	>75%

3.6.2 Segunda seleção

Cada agrupamento organizado na primeira seleção foi ordenado por meio de análise de componentes principais (PCA) executada com base na correlação entre os diferentes isolados reunidos em cada grupo. A PCA foi realizada com os resultados dos experimentos que avaliaram tolerância ao pH ácido e aos sais biliares, hidrofobicidade, auto-agregação e desconjugação de sais biliares. Esses resultados foram classificados em quartis para serem convertidos em códigos qualitativos conforme apresentado na Tabela 8. Os isolados bacterianos com dados localizados no primeiro quartil receberam código zero. Isolados de BAL que apresentaram resultados das variáveis localizados no segundo e terceiro quartis receberam código 1, enquanto os isolados que apresentaram resultados localizados no último quartil receberam o código 2. Esta conversão em códigos permitiu padronizar os resultados de todas as análises expressas em diferentes unidades (SPERANZA et al., 2017).

A PCA foi realizada com o software RStudio (R CORE TEAM, 2019). Todas as análises foram realizadas em triplicata em três ensaios independentes.

3.7 SOBREVIVÊNCIA DOS ISOLADOS SELECIONADOS EM DIFERENTES MATRIZES ALIMENTARES

3.7.1 Preparo dos isolados

Os isolados selecionados por meio das ferramentas estatísticas, descritas no item 3.6, foram incubados em caldo MRS a $37 \pm 0,5$ °C por 24 horas sob anaerobiose (Anaerogen) para atingir a fase estacionária de crescimento. Em seguida, foram centrifugados ($4500 \times g$, 10 minutos, 4 °C) e o sedimento resultante foi lavado duas vezes com STF por meio de centrifugação ($4500 g \times 10 \text{ min}$) e ressuscitado em solução salina tamponada com fosfato esterilizada (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na_2HPO_4 , 0,24 g/L de KH_2PO_4 , com

pH ajustado em 7,4) para obter suspensão de células com densidade óptica a 600 nm de 1,0, correspondendo a contagens de células viáveis entre 8 a 9 log de UFC/mL (DE ALBUQUERQUE et al., 2017; GARCIA et al., 2016).

3.7.2 Preparo das matrizes alimentares adicionadas dos isolados

Sucos comerciais de maçã e laranja (Natural OneTM, Jarinu, São Paulo, Brasil), ensopado de carne, purê de vegetais mistos (Nestlé Brasil, São José do Rio Pardo, São Paulo, Brasil) e leite UHT (Camponesa) sem aditivos ou conservantes foram adquiridos em supermercados localizados em João Pessoa-PB. Estes produtos foram esterilizados durante 15 minutos a 121 °C (1 atm) em autoclave e resfriados em banho de gelo até atingir $37 \pm 0,5$ °C. Posteriormente, foram testados para verificação da ausência de bactérias lácticas, bactérias mesófilas e fungos filamentosos e leveduriformes por meio da técnica de inoculação em superfície em placas contendo ágar MRS, ágar Padrão para Contagem e ágar *Sabouraud* dextrose (HiMedia), respectivamente, conforme procedimentos padronizados citados pela APHA (2015).

Alíquotas de 100 mL de cada produto alimentar foram inoculados assepticamente com 1 mL da suspensão de inóculo dos isolados (contagens finais de células viáveis de aproximadamente 7 log UFC/mL). Os isolados foram inoculados nos diferentes produtos de forma separada, os quais, em seguida, foram armazenados a $4 \pm 0,5$ °C durante 28 dias.

Nos dias 7, 14, 21 e 28 de armazenamento, uma alíquota de 1 mL de cada produto foi diluída em série em água peptonada esterilizada (10^{-1} - 10^{-5}) e uma alíquota de 100 µL foi inoculada em ágar MRS. Após incubação anaeróbia (Anaerogen) de 48 h a $37 \pm 0,5$ °C, as colônias visíveis foram contadas e os resultados expressos em log de UFC/mL.

3.7.3 Avaliação do estado fisiológico dos isolados selecionados em diferentes matrizes alimentares

3.7.3.1 Procedimento de coloração

Nos dias 7, 14, 21 e 28 de armazenamento refrigerado, as amostras dos alimentos inoculados com o isolado testado foram centrifugadas ($4500 \times g$, 10 minutos, 4 °C) e os sedimentos obtidos foram lavados duas vezes e ressuspensos em solução salina tamponada com

fosfato e submetidas ao procedimento de coloração com iodeto de propídio (PI, Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µg/mL e diacetato de carboxifluoresceína (cFDA, Sigma-Aldrich) na concentração de 2,5 µg/mL. As amostras submetidas a dupla coloração foram incubadas por 15 minutos em local escuro. Em seguida, estas suspensões foram centrifugadas (4500 g x 10 min, 4 °C) e lavadas em igual volume de tampão fosfato salino esterilizado a fim de remover o excesso dos fluorocromos. Finalmente, foram ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato estéril. Assim, as suspensões de células estavam adequadas para análise em citômetro de fluxo.

A coloração com estes fluorocromos foi realizada para avaliar a integridade da membrana citoplasmática (corante PI) e presença de atividade respiratória/metabólica (corante cFDA), respectivamente, nas células dos isolados inoculados nas diferentes matrizes (DE SOUZA PEDROSA et al., 2020; PAPARELLA et al., 2008).

3.7.3.2 Análises em citometria de fluxo

As análises foram realizadas com uso de citômetro de fluxo com emissão de laser de argônio a 488 nm e 640 nm (BD Accuri C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), contendo dois detectores de dispersão de luz (FSC e SSC) e quatro detectores de fluorescência. O detector de fluorescência denominado de canal FL1 detecta luz com comprimento de onda de 533 nm ± 30 nm e foi utilizado para coletar fluorescência na cor verde, a fim de verificar marcações com cFDA. O detector de fluorescência denominado de canal FL3 detecta luz com comprimentos de onda >670 nm foi utilizado para coletar fluorescência na cor vermelha, a fim de verificar marcações com PI.

Os níveis do limiar para aquisição de dados foram definidos com os detectores de dispersão de luz. Na dispersão direta (*forward scatter*, FSC) utilizou-se o valor de 30 000 e na dispersão lateral (*side scatter*, SSC) foi utilizado o valor de 12 000 com o intuito de eliminar partículas muito menores do que as células intactas e delimitar as células bacterianas, respectivamente.

Cada aquisição de amostra foi feita com uma configuração de baixa taxa de fluxo (12 mL/minuto) e um total de 10 000 eventos foram analisados por amostra. Foi utilizada uma compensação automática para os dados obtidos. A análise dos dados foi realizada com o software BD Accuri C6 (Becton Dickinson and Company) (DE SOUZA PEDROSA et al., 2020; PAPARELLA et al., 2008).

3.7.3.3 Interpretação dos resultados

Os gráficos de densidade indicando FSC no eixo Y *versus* SSC no eixo X foram projetados para identificar a população bacteriana de interesse. O parâmetro FSC fornece informações relativas ao tamanho da célula, enquanto o parâmetro SSC fornece informações sobre a granulosidade celular.

Para analisar os dados de dupla marcação foram projetados gráficos de densidade FL1 no eixo Y *versus* FL3 no eixo X. Os gráficos FL1 *versus* FL3 foram demarcados com quatro quadrantes, sendo um para cada subpopulação celular de acordo com a fluorescência detectada nas leituras, a saber: Para a coloração dupla com PI e cFDA, as subpopulações caracterizadas como PI-cFDA+ localizadas no quadrante superior esquerdo corresponderam ao percentual de células com membrana intacta e com atividade enzimática (células vivas); as subpopulações caracterizadas como PI+cFDA- localizadas no quadrante inferior direito corresponderam ao percentual de células com membranas permeabilizadas e sem atividade enzimática (células mortas); as subpopulações celulares caracterizadas como PI+cFDA+ localizadas no quadrante superior direito foram consideradas células permeabilizadas com atividade enzimática (células lesadas) (PAPARELLA et al., 2008).

Como controles positivos foram utilizadas suspensões de células das amostras que não foram submetidas ao processo de marcação. Como controle negativo foram utilizadas suspensões de células das amostras incubadas em etanol para promover morte celular. Ambos os controles foram lavados duas vezes com solução salina tamponada com fosfato esterilizada por meio de centrifugação ($4500 \times g$, 10 minutos, 4 °C).

O PI é uma molécula catiônica e hidrofílica, portanto, impermeável à membrana citoplasmática, somente penetrando na célula quando ocorrer dano na membrana citoplasmática. Esse marcador tem afinidade por ácidos nucleicos, sendo amplamente utilizado como indicador de integridade de membrana em células bacterianas. O cFDA é um ácido carboxílico aromático capaz de penetrar na membrana citoplasmática. Em células ativas, é hidrolisado enzimaticamente por acetilesterases, passando a emitir fluorescência polar que se acumula no citoplasma bacteriano, sendo, portanto, utilizado para indicar atividade enzimática ou metabólica nas células (GANDHI; SHAH, 2015; STRÄUBER; MÜLLER, 2010).

3.8 ADIÇÃO DE ISOLADOS DE *Limosilactobacillus fermentum* EM SUCOS DE FRUTAS

3.8.1 Isolados e preparo dos inóculos

Foram utilizados dois isolados de *Limosilactobacillus fermentum* (*L. fermentum* 139 e *L. fermentum* 263), previamente referidos como *Lactobacillus fermentum* (EFSA, 2000; ZHENG et al., 2020), obtidos de subprodutos do processamento de frutas (manga (*Mangifera indica* L.) e abacaxi (*Ananas comosus* L.), respectivamente) e previamente caracterizados em estudos *in vitro* e *in vivo* como tendo aptidões para uso como probióticos (CAVALCANTE et al., 2019; CAVALCANTI NETO et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2020; GARCIA et al., 2016).

Os isolados foram incubados em caldo MRS a $37 \pm 0,5$ °C por 18 horas sob anaerobiose (Anaerogen) para atingir a fase estacionária de crescimento. Após a incubação, as células no meio de cultivo foram centrifugadas ($4500 \times g$ por 10 minutos, 4 °C). O sedimento resultante foi lavado duas vezes e ressuspensionado em solução salina tamponada com fosfato esterilizada (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na_2HPO_4 , 0,24 g/L de KH_2PO_4 , com pH ajustado em 7,4) para obter suspensão de células com DO a 625 nm de 1, o que correspondeu a contagens de células viáveis entre 8 e 9 log UFC/mL (DE ALBUQUERQUE et al., 2017; GARCIA et al., 2016).

3.8.2 Sucos de frutas

Sucos comerciais de maçã e laranja (Natural One™) integrais e sem aditivos ou conservantes foram adquiridos em supermercados localizados na cidade de João Pessoa - PB. Os sucos foram esterilizados durante 15 minutos a 121 °C (1 atm) em autoclave e resfriados em banho de gelo até atingir 37 °C. Posteriormente, foram testados para verificação da ausência de bactérias lácticas, bactérias mesófilas e fungos filamentosos e leveduriformes por meio da técnica de inoculação em superfície de placas contendo ágar MRS, ágar Padrão para Contagem e ágar *Sabouraud* dextrose (HiMedia), respectivamente, conforme procedimentos padronizados (APHA, 2015).

Alíquotas de 500 mL de suco de maçã e de suco de laranja foram inoculados assepticamente com 5 mL da suspensão de inóculo dos isolados de *L. fermentum* (contagem final de células viáveis entre 7 e 8 logs UFC/mL). Cada isolado foi inoculado em cada suco de forma separada, sendo as amostras armazenadas a $4 \pm 0,5$ °C durante 28 dias.

3.8.3 Parâmetros físico-químicos dos sucos inoculados com *L. fermentum* durante o armazenamento

Nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento refrigerado ($4 \pm 0,5$ °C), as amostras foram submetidas às análises de acidez titulável, pH e sólidos solúveis totais, de acordo com os procedimentos descritos a seguir (AOAC, 2016).

3.8.3.1 Acidez titulável

A acidez titulável foi verificada a partir de uma alíquota de 5 mL de suco. Nesta alíquota foi adicionado 25 mL de água destilada e aproximadamente 3 gotas de fenoftaleína como indicador. A mistura foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1N e os resultados expressos em percentuais de ácido málico e ácido cítrico para suco de maçã e laranja, respectivamente (AOAC, 2016).

3.8.3.2 pH

O pH foi determinado com a utilização de potenciômetro de bancada (Modelo Q400AS, Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil). O eletrodo de vidro foi inserido diretamente em cada uma das alíquotas das amostras de suco, sendo as medidas realizadas a $25 \pm 0,5$ °C (AOAC, 2016).

3.8.3.3 Sólidos solúveis totais

O conteúdo de sólidos solúveis foi verificado com uso de um refratômetro digital (modelo HI 96801, Hanna Instruments, Barueri, São Paulo, Brasil) a $25 \pm 0,5$ °C. Cada uma das amostras de suco foi homogeneizada e, em seguida, uma alíquota foi transferida para o refratômetro com auxílio de uma pipeta graduada. Os resultados foram expressos em grau Brix (° Brix) (AOAC, 2016).

3.8.4 Contagens de células viáveis de *L. fermentum* em suco de maçã e laranja durante armazenamento refrigerado

Nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento refrigerado, alíquotas de 100 µL de suco de maçã e laranja inoculados com os isolados testados foram diluídas seriadamente (10^{-1} – 10^{-6}) em solução salina tamponada com fosfato esterilizada (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na_2HPO_4 , 0,24 g/L de KH_2PO_4 , com pH ajustado em 7,4) e inoculados em ágar MRS, por meio da técnica de micro gotas, seguindo-se por incubação sob anaerobiose (Anaerogen) a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas. Ao final do período de incubação, as colônias visíveis foram enumeradas e os resultados expressos em log UFC/mL (ESPÍRITO SANTO et al., 2015).

3.8.5 Contagens de células viáveis de *L. fermentum* em suco de maçã e laranja durante a digestão gastrointestinal simulada

Amostras de suco de maçã e laranja e caldo MRS inoculados com os isolados teste e amostras controle (sem adição dos isolados) foram expostas a condições simuladas *in vitro* referentes a cada etapa da digestão gastrointestinal (DE ALBUQUERQUE et al., 2017; GARCIA et al., 2018). Para tanto, alíquotas de 25 mL das amostras foram inseridas em frascos de vidro (50 mL), de modo que as etapas do processo de digestão simulada ocorreram de forma contínua e com aumento gradual do volume inicial de amostra à medida que as soluções de cada fase da digestão foram adicionadas ao sistema experimental.

O processo de simulação ocorreu conforme os estágios referentes à mastigação, esôfago-estômago, duodeno e íleo. A agitação mecânica foi utilizada para simular os movimentos peristálticos e todas as etapas foram realizadas sob temperatura de $37 \pm 0,5$ °C com agitação mecânica ajustada para cada fase em estufa incubadora (TE-424, Tecnal).

A mastigação foi simulada por meio da adição de solução de α -amylase (Sigma Aldrich) na concentração de 100 U/mL de CaCl_2 a 1 mM e pH ajustado para 6,9 com solução de 1M NaHCO_3 sob agitação de 200 rpm durante 2 minutos a $37 \pm 0,5$ °C. Em seguida, a fase de simulação da passagem pelo esôfago-estômago foi realizada a partir da adição de solução de pepsina (Sigma Aldrich) na concentração de 25 mg/mL de HCl a 0,1 N adicionada a uma razão de 0,05 mL/min e com redução gradual do pH da mistura usando solução de HCl a 1N e agitação de 130 rpm a $37 \pm 0,5$ °C durante toda a fase. As fases de redução do pH ocorreram da seguinte forma: em pH 5,5 durante 10 minutos; em pH 4,6 durante 10 minutos; em pH 3,8 durante 10

minutos; em pH 2,8 durante 20 minutos; em pH 2,3 durante 20 minutos; e em pH 2,0 durante 20 minutos. Logo após, a etapa do duodeno foi simulada com adição de solução contendo pancreatina (Sigma Aldrich) na concentração de 2 g de pancreatina/L de NaHCO_3 0,1M e solução de sais de bile (Sigma Aldrich) na concentração de 12 g de sais de bile bovino/L de NaHCO_3 0,1M com ajuste de pH para 5,0 com NaHCO_3 a 0,1M, sendo expostos durante 30 minutos sob agitação de 45 rpm. Por fim, a fase de simulação do íleo consistiu de ajuste de pH para 6,5 com solução de NaHCO_3 0,1M e tempo de exposição de 60 minutos sob agitação de 45 rpm a $37 \pm 0,5$ °C. Ao longo de todo o experimento, amostras de caldo MRS e dos sucos inoculados foram mantidos a $37 \pm 0,5$ °C sem exposição às condições simuladas do trato gastrointestinal, sendo utilizados como controle.

Após a exposição a cada etapa da digestão gastrointestinal simulada, alíquotas de 100 μL foram diluídas seriadamente em solução salina tamponada com fosfato esterilizada (10^{-1} – 10^{-6}), inoculadas em ágar MRS, por meio da técnica de inoculação em superfície, e incubadas sob anaerobiose (Anaerogen) a $37 \pm 0,5$ °C por 48 horas. Ao final do período de incubação, as colônias visíveis foram enumeradas e os resultados expressos em log UFC/mL.

3.8.6 Estado fisiológico de *L. fermentum* em sucos de maçã e laranja durante armazenamento refrigerado e quando exposto à digestão simulada

3.8.6.1 Procedimento de coloração

Nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento refrigerado e após a exposição a cada uma das etapas da digestão gastrointestinal simulada, amostras de suco de maçã e laranja e/ou de MRS inoculados com os isolados de *L. fermentum* foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato por meio de centrifugação ($4500 \times g$ durante 10 minutos a 4 °C) e submetidas a marcação dupla com solução de PI (Sigma-Aldrich) e cFDA (Sigma-Aldrich) conforme descrito previamente no item 3.7.3.1. Além disso, uma marcação dupla com PI (10 $\mu\text{g/mL}$) e ácido bis-1,3-dibutilbarbúrico (BOX, Invitrogen, 0,5 $\mu\text{g/mL}$) por 15 minutos em local escuro foi utilizada para avaliar a integridade da membrana citoplasmática e polarização de membrana das células, respectivamente. Após os procedimentos de coloração, as suspensões celulares foram lavadas com solução tampão de fosfato esterilizada por meio de centrifugação ($4500 \times g$ durante 10 minutos, 4 °C) para remover o excesso de corante (BUNTHOF; ABEE, 2002; DE SOUSA GUEDES et al., 2018; MAUKONEN et al., 2006).

3.8.6.2 *Análise de dados e interpretação dos resultados*

A aquisição e análise de dados foram feitos conforme descrito em 3.7.3.2 em citômetro de fluxo BD Accuri C6 (Becton Dickinson), com uma taxa de fluxo de 12 mL por minuto e um total de 10 000 eventos analisados por amostra.

A interpretação dos resultados foi realizada conforme descrito anteriormente na seção 3.7.3.3. As subpopulações celulares analisadas, de acordo com a fluorescência detectada nas leituras, foram: PI-cFDA+, correspondente ao percentual de células não permeabilizadas com atividade enzimática (células vivas); PI+cFDA-, correspondente ao percentual de células permeabilizadas sem atividade enzimática (células mortas); e PI+cFDA+, correspondente ao percentual de células permeabilizadas com atividade enzimática (células injuriadas). Para a coloração dupla com PI e BOX, as subpopulações caracterizadas como PI-BOX+ localizadas no quadrante superior esquerdo corresponderam ao percentual de células com membranas intactas, porém com membrana despolarizada. As subpopulações PI+BOX- localizadas no quadrante inferior direito corresponderam ao percentual de células com membranas permeabilizadas, porém polarizadas (ARAÚJO et al., 2020; DE PEDROSA et al., 2020).

As informações conceituais sobre a utilização de PI e cFDA para avaliação de integridade de membrana e atividade enzimática/metabólica foram descritas anteriormente na seção 3.7.3.3. O BOX é um corante lipofílico com carga aniônica, portanto, incapaz de atravessar membranas polarizadas, sendo utilizado para indicar polarização de membrana. Membranas despolarizadas permitem o acúmulo de BOX dentro das células, enquanto membranas polarizadas podem excluir esta molécula (GANDHI; SHAH, 2015; STRÄUBER; MÜLLER, 2010).

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS ADICIONAIS

Os experimentos de sobrevivência com contagem de células viáveis dos isolados inoculados em matrizes alimentares, bem como os dados dos percentuais das subpopulações marcadas e identificadas pela análise de citometria de fluxo foram realizados em triplicata em três repetições independentes. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Em seguida, os valores médios foram submetidos à

análise de variância de uma via seguida do teste de Tukey para determinar diferenças significativas entre os resultados.

A análise de redundância (RDA) foi realizada para avaliar a ocorrência de relação entre os parâmetros físico-químicos dos sucos de frutas inoculados com isolados de *L. fermentum* e parâmetros verificados nas análises de citometria de fluxo para tais isolados inoculadas ao longo do período de armazenamento. O teste de correlação de Pearson foi realizado para verificar a ocorrência de relação entre as contagens de células viáveis dos isolados de *L. fermentum* inoculadas em sucos de frutas e os parâmetros verificados nas análises de citometria de fluxo ao longo do período de armazenamento. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo para todas as análises estatísticas, as quais foram realizadas com o software RStudio (R CORE TEAM, 2019).

Na Figura 8 é apresentado o código QR para acesso as fotografias de etapas metodológicas e obtenção de resultados apresentados a seguir nesta tese.

Figura 8: Código QR para acessar fotografias de etapas metodológicas e obtenção de resultados.



FONTE: Nuvem de dados da autora localizado na plataforma Google®.

4 RESULTADOS

Os resultados desta tese estão apresentados na forma de dois artigos originais nos apêndices A e B. O primeiro artigo intitula-se “*Selection of lactic acid bacteria with probiotic aptitudes from fruit using measurements of in vitro technological and functional properties combined with multivariate statistical analysis and survival in different food matrices*”, o qual apresenta os resultados do isolamento e identificação de cepas de BAL encontradas em amostras de banana, laranja, maçã e uva. Foram obtidos 336 isolados, que apresentaram morfologia de BAL. Destes, 93 isolados foram pré-identificados, por meio da técnica de MALDI-ToF, como sendo identificados 26 isolados pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e 44 pertencentes ao gênero *Enterococcus*, enquanto 23 isolados não tiveram identificação segura quanto ao gênero. Em seguida, todos os isolados foram submetidos aos testes de segurança, incluindo atividade hemolítica e mucinolítica, atividade de DNase e gelatinase e produção de aminas biogênicas.

Foram excluídos 27 isolados com base nos resultados dos testes de segurança. Os 66 isolados remanescentes foram submetidos aos testes *in vitro* de potencial tecnológico, a citar: atividade proteolítica, produção de diacetil, produção de EPS e tolerância ao NaCl. Com a obtenção desses resultados, procedeu-se com a primeira seleção, que se baseou em uma análise de cluster, classificando os isolados em três grupos distintos com base na similaridade dos resultados encontrados. Em seguida, procedeu-se com os testes *in vitro* que avaliaram os potenciais efeitos probióticos dos isolados, a citar: tolerância a baixos valores de pH e a sais biliares e capacidade de hidrofobicidade, autoagregação e desconjugação de sais biliares. Os resultados obtidos nesses testes foram utilizados para realizar a segunda etapa da seleção por meio de PCA para ordenamento de cada um dos grupos. Três isolados de cada um dos três grupos foram selecionados para testes posteriores, a saber: suscetibilidade a antibióticos e atividade antagonista frente bactérias patogênicas.

Após os testes de suscetibilidade a antibióticos, foram escolhidos quatro isolados que apresentaram melhor perfil de sensibilidade a todos os antibióticos testados (Isolado 1 e 16 do cluster 1 e isolados 1 e 3 do cluster 2), os quais também apresentaram atividade antagonista frente *E. coli* e *L. monocytogenes*. Estes isolados foram submetidos à identificação por meio do sequenciamento da região 16s rRNA, que os identificou como *Lactobacillus* sp. (isolado 1 do cluster 1 e isolados 1 e 3 do cluster 2) e *Levilactobacillus brevis* (Isolado 16 do cluster 1). Em seguida, os quatro isolados identificados foram incorporados em diferentes matrizes alimentares e armazenados sob refrigeração durante 28 dias. Semanalmente, a viabilidade e o

estado fisiológicos das bactérias foi avaliado e verificou-se que estes isolados apresentam boa capacidade de sobrevivência em leite UHT integral, purê de vegetais, ensopado de carnes e sucos de laranja e maçã. Durante este período de armazenamento, os isolados permaneceram com contagens acima de 6 log UFC/mL e apresentaram percentuais elevados de células (subpopulações) com membrana intacta e atividade enzimática (células vivas) em todos as matrizes testadas, embora estes valores tenham sido maiores quando inoculados em sucos de frutas. Portanto, este protocolo de isolamento e seleção de cepas probióticas foi eficaz para aplicação em BAL isoladas de frutas com o intuito de uso como probióticos em alimentos.

O segundo artigo intitula-se “*Combined assessment of viable counts and physiological states of fruit-derived probiotic *Limosilactobacillus fermentum* to investigate the potential suitability of apple and orange juice as delivery vehicles*”. Este artigo apresenta os resultados da análise do perfil de sobrevivência por meio de contagem em placas e avaliação de características fisiológicas de duas cepas de *L. fermentum*, isoladas e caracterizadas previamente como tendo potencial probiótico, quando inseridos em sucos de maçã e laranja e armazenados sob refrigeração durante 28 dias, bem como quando submetidos a condições simuladas do processo de digestão gastrointestinal nestes substratos.

Os isolados testados apresentaram boa capacidade de sobrevivência quando inseridos em sucos de frutas ao longo do armazenamento e quando submetidas ao processo de digestão simulada. As contagens de células viáveis permaneceram >6 log UFC/mL durante todo o período de armazenamento e >4,8 log UFC/mL ao longo do processo de digestão gastrointestinal simulada. Os percentuais de células com atividade enzimática e membrana intacta apresentaram-se elevados (>30%) durante todo o período de armazenamento e digestão gastrointestinal simulada. O percentual de células com danos na membrana, por sua vez, variou entre os dois isolados testados, sendo reduzido em *L. fermentum* 139 e aumentado em *L. fermentum* 263 durante o período de armazenamento. A exposição às diferentes etapas do processo de digestão gastrointestinal favoreceu o aumento dos danos na membrana dos dois isolados testados.

A análise de redundância permitiu avaliar como alguns parâmetros físico-químicos podem interferir na sobrevivência dos isolados inseridos em sucos de frutas durante o armazenamento. Foi verificado que o aumento no teor de ácidos orgânicos e sólidos solúveis nos sucos de frutas promoveu aumento na despolarização da membrana, enquanto reduziu as subpopulações que apresentaram danos a membrana e morte celular das cepas. Por sua vez, o pH próximo da neutralidade favoreceu o aumento de células com membrana intacta e atividade enzimática. Também foi observada correlação positiva entre as contagens em placas de células

viáveis e os percentuais de células de cepas com membrana intacta e atividade enzimática ao longo do armazenamento. Portanto, a destacável capacidade das cepas de *L. fermentum* 139 e *L. fermentum* 263 de sobreviverem nos sucos de laranja e maçã as caracterizam como candidatas para uso na elaboração de sucos de frutas adicionados de probióticos.

REFERÊNCIAS

- AGRIOPOULOU, S. et al., Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. **Microorganisms**, v. 8, n. 952, p. 1-23, 2020.
- ALFONZO, A.; et al. Monitoring of wheat lactic acid bacteria from the field until the first step of dough fermentation. **Food Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 256-269, 2017.
- AMORIM, J. C. et al. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. **Food Research International**, v.107, n. 1, p. 518-527, 2018.
- ANDERSON, R. C. et al. Human Oral Isolate *Lactobacillus fermentum* AGR1487 Reduces Intestinal Barrier Integrity by Increasing the Turnover of Microtubules in Caco-2 Cells. **Plos One**, v. 8, n. 11, p. 1-12, 2013.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. Brasília: GUIA nº 21, **ANVISA**, 2019.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília: **ANVISA**, 2008.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists International. 20th ed. Salt Lake City: **AOAC International**, 2016.
- APHA. **Compendium for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association. Washington; DC: [s.n.], 2015.
- ARAÚJO, C. M. et al. Protective effects of tropical fruit processing coproducts on probiotic *Lactobacillus* strains during freeze-drying and storage. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2020.
- AWASTI, N. et al. Probiotic and functional characterization of bifidobacteria of Indian human origin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 1021–1032, 2016.
- BARBOSA, J.; TEIXEIRA, P. Development of probiotic fruit juice powders by spray-drying: a review. **Food Review International**, v. 33, n. 4, p. 335-358, 2017.
- BENÍTEZ-CABELLO, A. et al. exploring bacteria diversity in commercialized table olive biofilms by metataxonomic and compositional data analysis. **Nature: Scientific reports**, v. 10, n. 11381, p. 1-13, 2020.
- BEVILACQUA, A. et al. A preliminary report on the use of the design of experiments for the production of a synbiotic yogurt supplemented with Gluten Friendly™ flour and *Bifidobacterium infantis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 226, p. 1-11, 2019.

- BUJNAKOVA, D.; STRAKOVA, E. Safety, probiotic and technological properties of Lactobacilli isolated from unpasteurised ovine and caprine cheeses. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 813–826, 2017.
- BUNTHOF, C. J.; ABEE, T. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2934–2942, 2002.
- BYNDLOSS, M. X. et al. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. **Science**, v. 357, n. 1, p. 570-575, 2017.
- CÂMARA S. C. et al. Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. **Food Science and Technology International**. v. 25, n.4, p. 303-317, 2018.
- CAPORASO, J. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.
- CASSANI, L. et al. Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut: From food processing and storage to their passage through the gastrointestinal tract. **Food Research International**, v. 129, n. August 2019, p. 1-52, 2020.
- CAVALCANTE, R. G. S. et al. The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 29, n. 12, p. 1408–1417, 2019.
- CAVALCANTI NETO, M. P. et al. Gut microbiota and probiotics intervention: A potential therapeutic target for management of cardiometabolic disorders and chronic kidney disease? **Pharmacological Research**, v. 130, p. 152–163, 2018.
- CHARTERIS, WILLIAM P. et al. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Lactobacillus Species. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1636–1643, 1998.
- CHEN, Y. S. et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with banana fruits in Taiwan. **Current Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 484-490, 2017.
- CHOPADE, L. R. et al. Finding out potent probiotic cultures from ayurvedic formulation Takrarishta through *in-vitro* probiotic characterization and principal component analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, n. 1, p. 205-212, 2019.
- CHUNG, H. J. et al. Metabolic and lipidomic profiling of vegetable juices fermented with various probiotics. **Biomolecules**, v. 10, n. 725, p. 1-17, 2020.
- CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards of antimicrobial susceptibility testing. **Twenty-Second Informational Supplement.CLSI document M100-22**, p.151, 2012.
- COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. 2 ed. Rio de Janeiro: **Rubio**, 2016.
- DASSI E. et al. The short-term impact of probiotic consumption on the oral cavity microbiome. **Nature: Scientific Reports**. v. 8, n. 10476, p. 1-8, 2018.

DE ALBUQUERQUE, T. M. R. et al. In Vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 4, p. 704–716, 2018.

DE OLIVEIRA, Y. et al. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* post-weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in rat offspring exposed to maternal dyslipidemia. **Food and Function**, v. 11, n. 6, p. 5581–5594, 2020.

DE SOUZA PEDROSA, G. T. et al. Physiological alterations involved in inactivation of autochthonous spoilage bacteria in orange juice caused by *Citrus* essential oils and mild heat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 334, n. August, p. 108837, 2020.

DE SOUSA GUEDES, J. P.; DE SOUZA, E. L. Investigation of damage to *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis exposed to *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in pineapple and mango juice by flow cytometry. **Food Microbiology**, v. 76, p. 564–571, 2018.

DE VADDER, Filipe et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. **Cell**, v. 156, n. 1–2, p. 84–96, 2014.

DEVI, S. M. et al. Discrimination and divergence among *Lactobacillus plantarum*-group (LPG) isolates with reference to their probiotic functionalities from vegetable origin. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 562–570, 2016.

DI CAGNO, R. et al. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1–10, 2013.

DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Gut-brain axis in 2016: Brain-gut-microbiota axis-mood, metabolism and behaviour. **Nature reviews**, v. 14, n. 1, p. 69–70, 2017.

DING, W. et al. Characterization of antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented yak milk in the Tibetan Plateau. **Journal of Functional Foods**, v. 35, n. 1, p. 481–488, 2017.

DOMINGOS-LOPES, M. F. P.; et al. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 178–190, 2017.

EFSA - European Food Safety Authority. Scientific Opinion: Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, n. 5, p. 1–10, 2012.

EFSA - European Food Safety Authority. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. EFSA J. 18, e06174, 2020. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6174>

ENDO, A. et al. Food matrices and cell conditions influence survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG under heat stresses and during storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, n. 1, p. 110–12, 2014.

ESPIRITO-SANTO, A. P. et al. Apple, grape or orange juice: Which one offers the best substrate for lactobacilli growth? - A screening study on bacteria viability, superoxide

dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. **Food Research International**, v. 78, p. 352–360, 2015.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **FAO and Nutrition Paper**. WORLD HEALTH ORGANIZATION: Roma, 2006.

FILANNINO, P. et al. Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 64-72, 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Substances Generally Recognized as Safe: Proposed rule. **Federal Register**. [S.l: s.n.], 1997.

FOYSAL, M. D. J. et al. *Lactobacillus acidophilus* and *L. plantarum* improve health status, modulate gut microbiota and innate immune response of marron (*Cherax cainii*). **Nature: Scientific Reports**, v. 10, n. 5916, p. 1-13, 2020.

FUJITA, A. et al. Improving anti-hyperglycemic and anti-hypertensive properties of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) using lactic acid bacterial fermentation. **Process Biochemistry**, 2017.

GALANAKIS, C. M. Functionality of food components and emerging technologies. **Foods**, v. 10, n. 128, p. 2-26, 2021.

GANDHI, A.; SHAH, N. P. Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry. **Food Microbiology**, v. 49, p. 197–202, 2015.

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 in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1371-11, 2016.

GAUCHER, F. *et al.* Review: Adaptation of beneficial propionibacteria, lactobacilli, and bifidobacteria improves tolerance toward technological and digestive stresses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 1–22, 2019.

GEORGE, F.; et al. Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. **Frontiers in Microbiology**, pre-proof, p. 2890-2899, 2018.

GOMAND, F. et al. Food matrix design for effective lactic acid bacteria delivery. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 285-310, 2019.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2011.

GRANATO D. et al. Trends in chemometrics: Food authentication, microbiology, and effects of processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**^f, v. 00, n. 1, p. 1-15, 2018.

GU, Q. et al. Enhancing vitamin b12 content in soy-yogurt by *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, n. 1, p. 56-59, 2015.

GUERRA-ORDAZ, A. A. et al. Lactulose and *Lactobacillus plantarum*, a potential complementary synbiotic to control postweaning colibacillosis in piglets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 15, p. 4879-4886, 2014.

GUIMARÃES, G. M. et al. Cocoa pulp as alternative food matrix for probiotic delivery. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 11, n. 1, p. 82-90, 2020.

GUO L. et al. Effects of lactic acid bacteria isolated from rumen fluid and feces of dairy cows on fermentation quality, microbial community, and in vitro digestibility of alfalfa silage. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 2998, p. 1-11, 2020.

HANA, J. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. **Italian Journal of Food Science**, v. 27, n. 3, p. 282–289, 2015.

HILL, Colin et al. Expert consensus document: 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, n. 8, p. 506–514, 2014.

HORVATH, A. et al. Changes in the intestinal microbiome during a multispecies probiotic intervention in compensated cirrhosis. **Nutrients**, v. 12, n. 1874, p. 1-11, 2020.

IACONELLI, C. et al. 2015. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. **Journal of Biotechnology**, v. 214, n. 1, p. 17–26, 2015.

JAMES, A.; WANG, Y. Characterization, health benefits and applications of fruits and vegetable probiotics. **CYTA – Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 770-780, 2019.

KAREB, O.; AIDER, M. Quorum sensing circuits in the communicating mechanisms of bacteria and its implication in the biosynthesis of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1-13, 2019.

KEMSLEY, E. K. et al. Multivariate statistics: Considerations and confidences in food authenticity problems, **Food Control**, v. 105, n. 1, p. 102–112, 2019.

KUMAR, B. V. et al. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal Food Science and Technology**. v. 52, n. 10, p. 6112-6124, 2015.

KÜNG, D. et al. Stability of microbiota facilitated by host immune regulation: Informing probiotic strategies to manage amphibian disease. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2014.

LANG, J. M. et al. The microbes we eat: abundance and taxonomy of microbes consumed in a day's worth of meals for three diet types. **PeerJ**, v. 659, n. 1, p. 1-19, 2014.

LEBLANC, J. G. et al. B-group vitamin production by lactic acid bacteria—current knowledge and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1297-1309, 2011.

LEMAIRE, M. et al. Addition of dairy lipids and probiotic *Lactobacillus fermentum* in infant formula programs gut microbiota and entero-insular axis in adult minipigs. **Nature: Scientific Reports**, v. 8, n. 1656, p. 1-16, 2018.

LEVIT, R. et al. Evaluation of the effect of soymilk fermented by a riboflavin-producing *Lactobacillus plantarum* strain in a murine model of colitis. **Beneicial Microbes**, v. 8, n. 1, p. 65-72, 2016.

LEVY, M. et al. Dysbiosis and the immune system. **Nature Immunology**, v. 17, p. 219-232, 2017.

LINARES, D. M. et al. Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 846, p. 1-11, 2017.

LISKO D. J. et al. Effects of dietary yogurt on the healthy human gastrointestinal (GI) microbiome. **Microorganisms**, v. 5, n. 6, 2017.

LONGIN, C. et al. Application of flow cytometry to wine microorganisms. **Food Microbiology**, v. 62, p. 221–231, 2017.

MAMHOUD, A.; et al. Selection of lactic acid bacteria isolated from Tunisian cereals and ex-ploitation of the use as starters for sourdough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 225, n. 0, p. 9-19, 2016.

FERNÁNDEZ, M. et al. Impact on human health of microorganisms present in fermented dairy products: An overview. **BioMed Research international**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

MAUKONEN, J. et al. Suitability of the fluorescent techniques for the enumeration of probiotic bacteria in commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products. **Food Research International**, v. 39, n. 1, p. 22–32, 2006.

MAUKONEN, J.; SAARELA, M. Human gut microbiota: does diet matter? Conference on ‘Diet, gut microbiology and human health’ Symposium 3: Diet and gut metabolism: linking microbiota to beneficial products of fermentation. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 74, n. 1, p. 23 –36, 2015.

MIN, M.; et al. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 59, n. 16, p. 2626–2641, 2019.

MISSAOUI, J. et al. Fermented seeds (“Zgougou”) from Aleppo pine as a novel source of potentially probiotic lactic acid bacteria. **Microorganisms**, v. 7, n. 709, p. 1-11, 2019.

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

NATURE, VÍDEOS. Immunology in the gut mucosa. Coordenação de Nature Immunology em colaboração com os Arkitek Studios. **Youtube**. Disponível em <https://www.youtube.com/watch?v=gnZEge78_78>. Acesso em: 14 de jul. 2020.

NEFFE-SKOCINSKA, K. et al. Trends and possibilities of the use of probiotics in food production. **Alternative and Replacement Foods**, chapter. 3, p. 65-94, 2018.

- CASTANET, M. et al. Early effect of supplemented infant formulae on intestinal biomarkers and microbiota: A randomized clinical trial. **Nutrients**, v. 12, n. 5, 2020.
- NUNES, C. A. et al. The use of statistical software in food science and technology: Advantages, limitations and misuses. **Food Research International**, v. 75, p. 270–280, 2015.
- OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2009.
- OLIVEIRA, G.; GONZÁLEZ-MOLERO, I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. **Endocrinología y Nutrición**. v. 824, n. 1, p. 1-13, 2016.
- PAPARELLA, A. et al. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 19, p. 1174–1182, 2008.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2019. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.
- RAJOKA, M. S. R.; et al. Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, n. 1, p. 271-280, 2017.
- REDDY, L. V. et al. Production of probiotic mango juice by fermentation of lactic acid bacteria. **Microbiology and Biotechnology Letters**. v. 43, n. 2, p. 120-125, 2015.
- REID, G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v.30, n. 1, p. 17-25, 2016.
- RICCI, A. et al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 6: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2017. **EFSA Journal**. [S.l: s.n.], 2017.
- RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2010.
- ROBERTS J. J.; COZZOLINO, D. an overview on the application of chemometrics in food science and technology—An approach to quantitative data analysis. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 1, p. 3258-3267, 2016.
- ROOBAB, U. et al. Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. **Food Microbiology: Current Opinion in Food Science**, v. 32, n. 1, p. 17-28, 2020.
- SAAD, S. M. I. et al. **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011.
- SAARELA, M. et al. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 1, p. 1477-1482, 2016a.
- SAARELA, M.; et al. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 171-178, 2016b.

- SADRANI, H. et al. Screening of potential probiotic lactobacillus strains isolated from fermented foods, fruits and of human origin. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 2, p. 216-225, 2014.
- SAMEDI, L.; CHARLES, A. L. Isolation and characterization of potential probiotic lactobacilli from leaves of food plants for possible additives in pellet feeding. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 64, n. 1, p. 55–62, 2019
- SAMPAIO, K. B. et al. Development and in vitro evaluation of novel nutraceutical formulations composed of *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin and/or resveratrol. **Food Chemistry**, v. 342, n. February 2020, p. 128264, 2021.
- SANTINI, C. et al. Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. SUPPL., p. S98–S108, 2010.
- SANTOS, K. M. O. et al. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1463–1471, 2014.
- SHARMA, K. et al. Selection of indigenous *Lactobacillus paracasei* CD4 and *Lactobacillus gastricus* BTM 7 as probiotic: assessment of traits combined with Principal Component analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 5, p. 1310-1320, 2017.
- SHEHATA, M. G.; et al. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. **Annals of Agricultural Science**, v. 61, n. 1, p. 65-75, 2016.
- SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1–8, 2016.
- SIMONE, C. The unregulated probiotic market. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 1, p. 809-817, 2019.
- SOLIERI, L. et al. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. **Food Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 240-249, 2014.
- STRÄUBER, H.; MÜLLER, S. Viability states of bacteria - Specific mechanisms of selected probes. **Cytometry Part A**, v. 77, n. 7, p. 623–634, 2010.
- SUBHASHREE, S.; KAVITA, M. S. A Study on suitable non dairy food matrix for probiotic bacteria - A systematic review. **Current Research in Nutrition and Food Science Journal**, v. 7, n. 1, p. 05-16, 2019.
- SUN, Z.; et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. **Nature Communications**, v. 6, n. 8322, p. 1-13, 2015.
- TERPOU, A.; et al. Probiotics in food systems: Significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**, v. 11, n. 1591, p. 1-32, 2019.

TODOROV, S. D. et al. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 465–477, 2008.

TOMASIK, J. et al. immunomodulatory effects of probiotic supplementation in schizophrenia patients: A randomized, placebo- controlled trial. **Biomarker insights**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2015.

TOURET, T. et al. Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. **Plos One**, v. 0, n. 1, p. 1-16, 2018.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 2014.

TRUONG, V. K. et al. From academia to reality check: A theoretical framework on the use of chemometric in food sciences. **Foods**, v. 8, n. 164, p. 1-10, 2019.

VALDES, A. M. et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. Science and politics of nutrition, v. 361, s. 1, p. 36-44, 2018.

VALDES, A.M. et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ (Online)*, v. 361, p. 36–44, 2018.

VASCONCELOS B.G. et al. Innovative Açai (*Euterpe oleracea*, Mart., Arecaceae) functional frozen dessert exhibits high probiotic viability throughout shelf-life and supplementation with inulin improves sensory acceptance. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 1843-1849, 2014.

VENEGAS-ORTEGA, M. G. et al. Multi-functional potential of presumptive lactic acid bacteria isolated from chihuahua cheese. **Foods**, v. 9, n. 276, p. 1-15, 2020.

VERÓN, H. E. et al. Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. **LWT - Food Science and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 231-240, 2017.

VITALI, B.; et al. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 116-125, 2012.

WANG, J. et al. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* yw11 isolated from tibet kefir. **Carbohydrate Polymers**, v. 125, n. 1, p. 16-25, 2015.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

WANG, X. et al. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during chinese liquor fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 1-13, 2018.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **Plos One**, v. 4, n. 10, 2009.

WILKINSON, M. G. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, n. December 2017, p. 1–10, 2018.

WORAPRAYOTE, W.; et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**. v. 120, n. 1, p. 118–132, 2016.

WU, C. et al. Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. **Critical Reviews in Microbiology**, 2017.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.

ZINNO, P. et al. Impact of NaCl reduction on lactic acid bacteria during fermentation of Nocellara del Belice table olives. **Food Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 239–247, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO 1:

Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are among the most prevalent microorganisms forming the autochthonous microbiota of fruit. This study aimed to select LAB isolates with probiotic aptitudes from apple, banana, grape and orange through evaluation of *in vitro* safety, technological and functional-related properties. The ability of most promising selected isolates to survive in commercial apple and orange juice, meat stew, vegetable puree and UHT milk during 28 days of refrigeration storage was also evaluated. Ninety-three isolates identified preliminarily as LAB were recovered from fruit and 66 of these isolates passed safety tests. Most of these isolates were pre-identified as lactobacilli or enterococci based on MALDI-ToF MS profiling. These 66 isolates were categorized into three homogeneous groups based on a preliminary cluster analysis run with data from experiments to measure technological characteristics. Nine LAB isolates were selected as the most promising for probiotic use based on a principal component analysis run with data from experiments to measure probiotic-related properties. Four of these isolates were sensitive to different antibiotics and identified (16S-rRNA gene sequencing) as *Lactobacillus brevis* (recently reclassified as *Levilactobacillus brevis*) or *Lactobacillus* sp. These 4 selected isolates had high viable counts and high percentages of physiologically active cells in apple and orange juice, beef stew, vegetable puree and UHT milk during refrigeration storage. These results showed that apple, banana, orange and grape are potential sources of LAB with aptitudes to be exploited for a possible probiotic use and distinguished abilities to survive in different food matrices.

Keywords: Fruit; lactic acid bacteria; technological characteristics; probiotic characteristics; multivariate analysis.

Introduction

Probiotics are microorganisms capable of promoting the balance of intestinal microbiota when administered in adequate doses [1,2], causing a variety of health promotion effects on host, such as enhancement of host immunity, reduction of lactose intolerance, decreased incidence and

severity of diarrhea episodes and protection against oxidative stress [3,4,5]. Fermented dairy products have been the most common matrices for delivery of probiotic lactic acid bacteria (LAB), being yogurt the most popular product [6,7]. However, presence of allergens, fat content, lactose intolerance and religious or philosophical beliefs have limited the ingestion of probiotic dairy products by an increasing number of consumers [8].

These aspects have stimulated the search for lactic acid bacteria (LAB) with aptitudes for use as probiotics not only from usual dairy matrices or human origin but also from plant matrices, with a perspective of increasing the possibilities of the use of these isolates for development of different probiotic foods, attending both traditional and emerging market [8,9]. Use of commercially available probiotic LAB in plant-based foods has been a challenge because of the ordinary difficult to reach moderate to high probiotic survival rates in these vehicles [8,10]. Studies have found results indicating that LAB from fruit and vegetables with performance compatible with probiotic use could survive in plant-based food formulations, which have typically harder conditions to probiotic survival when compared to dairy matrices [11,12,13,14].

Considering that LAB are among the most prevalent microorganisms forming the autochthonous microbiota of fruit and vegetables [11], a high number of LAB isolates could be recovered from these sources in investigations to search candidates for use as probiotics, resulting in a large amount of data to be interpreted. Multivariate statistical analysis has been considered useful approach to identify distinct characteristics of interest in a high number of bacterial isolates and segregate isolates with most promising aptitudes. Use of multivariate approaches has been successfully applied to select LAB from meat and fish with distinct technological and/or probiotic-related properties [15,16]; however, there is a lack of studies using this approach to select LAB with probiotic-related characteristics from fruit. The selection of probiotic strains has commonly considered several aspects, including safety for consumer, physiological functionalities and capability of surviving during exposure to gastrointestinal conditions. Technological characteristics influencing the food stability and quality should be also evaluated to direct the incorporation of these isolates into formulations with distinct characteristics [17].

This study aimed to select LAB isolates with promising probiotic aptitudes from different fruit with measurements of *in vitro* technological and functional-related properties combined with multivariate statistical analysis. Isolates with most promising probiotic aptitudes were evaluated for their capability of surviving in different food matrices during refrigeration storage through measurements of viable counts and cell physiological states.

Material and methods

Isolation and preliminary identification of LAB

A total of 108 fresh fruit samples comprised of apple (*Malus domestica*, 27 samples), banana (*Musa* spp., 27 samples), grape (*Vitis vinifera*, 27 samples) and orange (*Citrus sinensis*, 27 samples) in commercial maturity stage, with absence of visible signs of infection and mechanical damage were obtained from different producers in EMPASA (Supplies and Services Company of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil). Fruit were washed with sterile distilled water, air-dried at room temperature (25 ± 0.5 °C) and cut in small pieces (pulp + peel) with a sterile stainless knife on a sterile glass tray [14,18]. Fruit samples were processed for analysis using standard procedures [19,20] and dilution aliquots (100 µL) were plated on de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (HiMedia, Mumbai, India) and incubated anaerobically (Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK) at 37 °C for 48 h. At the end of the incubation period, at least 5 colonies with different morphologies were randomly recovered and maintained on MRS agar (4 ± 0.5 °C) [12,19].

Isolates presumptively identified as LAB (catalase negative, non-motile, Gram-positive cocci or rods) [20] were stored at -20 °C in MRS broth (HiMedia) with glycerol (Sigma Aldrich, St. Louis, MA, USA; 15 mL/100 mL) and further submitted for a pre-identification step with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS) technique [12]. Measurements of MALDI-ToF MS spectra were done with a Bruker Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics) and mass spectra were processed with MALDI Biotyper™ 3.1 software (Bruker Daltonics). Results of identification were expressed as BioTyper log (scores) indicating the similarity of unknown MALDI-ToF MS profile with available database entries. All isolates presumptively identified as LAB were evaluated regarding their safety characteristics.

Evaluation of safety characteristics of LAB

Hemolytic activity

A previously proposed blood agar [21] was used to evaluate hemolytic activity. Inoculated blood agar plates (37 °C, 48 h) were examined for appearance of β -haemolysis (clear zones surrounding colonies), α -haemolysis (green zones surrounding colonies) and γ -haemolysis (no zones surrounding colonies; no hemolytic activity) [21].

Mucinolytic activity

Mucinolytic activity was examined with bacteriological agar (1.2 g/100 mL) without glucose and with glucose (Sigma-Aldrich, 3 g/100 mL) added of partially purified porcine gastric

type III mucin (Sigma-Aldrich, 0.5 g/100 mL). Inoculated agar plates (37 °C, 48 h) were stained with 0.1% (w/v) amido black (Sigma-Aldrich) in 3.5 mol/L acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany), washed with 1.2 mol/L acetic acid (Merck) and appearance of a clear zone surrounding the colonies was considered positive for mucinolytic activity [22].

Gelatinase activity

Gelatinase activity was examined with a previously proposed gelatin agar [23]. Inoculated plates (37 °C, 48 h) were flooded with saturated ammonium sulphate (Merck) and appearance of a clear zone surrounding the colonies was considered indicative of gelatinase activity [23].

DNase activity

DNase activity was examined with DNase agar (Sigma-Aldrich). Inoculated plates (37 °C, 48 h) were flooded with 1 mol/L HCl (Merck) and appearance of a clear pink zone surrounding the colonies was indicative of DNase activity [23].

Biogenic amine production

Biogenic amine production was examined with a previously proposed agar [23] supplemented with an amine precursor amino acid (Sigma-Aldrich; 0.2 g/100 mL; L-histidine: precursor of histamine; L-lysine precursor of cadaverine). The alteration of inoculated media (37 °C, 48 h) color from green to purple, as a result of a pH increase due to amino acid decarboxylation, was indicative of biogenic amine production [23].

Results of experiments to evaluate DNase, gelatinase, mucinolytic and hemolytic activity and production of specific biogenic amines were considered as exclusion criteria. Isolates with positive activity for DNase, gelatinase, mucinolytic and hemolytic activity and biogenic amine production were not included in further experiments. All isolates passing the safety tests were examined for *in vitro* technological and probiotic-related properties. Prior to use in these tests, the isolates were activated with an anaerobic cultivation (24 h, 37 °C) in MRS broth, being used bacterial suspensions with viable counts of approximately 6 log CFU/mL [12, 17].

Evaluation of *in vitro* technological properties of LAB

Proteolytic activity

Proteolytic activity was examined with plate count agar (HiMedia) with lactose-free UHT skim milk (Camponesa, Lagoa da Prata, Minas Gerais, Brazil; 10 g/100 mL). Inoculated plates

(37 °C, 48 h) were flooded with 1 mol/L HCl (Merck) and appearance of a clear zone surrounding the colonies was indicative of proteolytic activity [23].

Diacetyl production

Diacetyl production was examined in UHT milk (Camponesa, 5 mL) with 0.5 mL α -naphthol (Sigma Aldrich, 1%, w/v) and KOH (Sigma Aldrich, 16%, w/v) [17]. The formation of a vivid, red-coloured ring at the top of inoculated milk was recorded as strong dyacetil production, a lighter shade or afaded red tonality as low production and a not appearance of ring as negative production.

Exopolysaccharide production

Isolates were cultured in MRS broth with glucose (Sigma-Aldrich, 2% w/v, 3 days, 37 °C). Cells were collected, homogenized with 95% cold ethanol (Química Moderna) and induced exopolysaccharide (EPS) precipitation. Dry weight (mg/L) was measured to determine the amount of EPS produced [24].

Tolerance to sodium chloride

MRS broth with sodium chloride (NaCl, Merck; 2, 4 and 8% w/v) was used to evaluate NaCl tolerance. Results were expressed as percent of survival rates, *i.e.* the difference between the viable counts found in MRS broth with tested NaCl concentration with those found in MRS broth without NaCl (control) [17]. A detection limit of 2 log CFU/mL was used in these assays.

Acidification capacity

Acidification capacity was evaluated in MRS broth with measurements of inoculated media pH at time zero (just after inoculation) and after 24 h (37 °C) [24]. Results were expressed as pH reduction when compared to pH found at time zero.

Evaluation of *in vitro* probiotic-related properties

Acid and bile salt tolerance

Tolerance to different pH values and bile salt concentrations was evaluated in phosphate buffer solution [PBS (0.05 mol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄) with pH adjusted to 2 or 3 with 1 mol/L HCl (Merck) or with 0.5% (w/v) bile salts (Sigma-Aldrich) following different exposure time intervals (1, 2, 3, 4 and 6 h). Results were expressed as log CFU/mL [22]. A detection limit of 2 log CFU/mL was used in these assays.

Bile salt deconjugation

Bile salt deconjugation was evaluated in MRS agar with 0.5% (w/v) taurodeoxycholic acid (Sigma-Aldrich) and glycodeoxycholic acid (Sigma-Aldrich). Appearance of an opaque zone surrounding the colonies grown on agar (37 °C, 48 h) was indicative of bile salt deconjugation [25].

Cell surface hydrophobicity

Cell surface hydrophobicity was measured in MRS broth with N-hexadecane (Sigma-Aldrich) with absorbance reading at 560 nm. Cell surface hydrophobicity was calculated with the equation: $\%H = [(H_0 - H) / H_0] \times 100$, where H_0 and H refers to absorbance value determined before and after extraction with N-hexadecane, respectively [25].

Autoaggregation

Cells of isolates grown in MRS broth were harvest and diluted in sterile saline solution (NaCl 0.85 g/100 mL) to achieve an absorbance at 660 nm of 0.3. After a 60 min-incubation at 37 °C, the absorbance was measured again. Autoaggregation was determined with the equation: $\% \text{ autoaggregation} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$, where A_0 refers to initial absorbance value and A refers to absorbance value determined after the 60 min-incubation [26].

Experiments to measure safety, technological and probiotic-related properties were done in triplicate in three independent experiments.

Selection of most promising isolates for probiotic use with multivariate analysis

As a first step, results of experiments to evaluate proteolytic activity, production of diacetyl and EPS, acidification capacity and tolerance to NaCl were converted into qualitative codes (Table 1) and used to run a hierarchical cluster analysis to divide isolates into homogeneous groups in a dissimilarity approach. Data of quantitative variables (acidification capacity, EPS production and NaCl tolerance) were organized in quartiles. Data of EPS production and NaCl tolerance located in the first quartile received the code zero, data located in the second and third quartiles received the code 1 and data located in the fourth quartile received the code 2. Data for acidification capacity received the code zero when the pH reduction was of <1 , code 1 when the pH reduction was of $1 - 1.5$ and code 2 when the pH reduction was of >1.5 [16]. For diacetyl production (qualitative variable), a code zero was used for absence of activity, code 1 for weak

activity and code 2 for strong activity; while for proteolytic (qualitative variable), a code zero was used for absence of activity and code 1 for presence of activity.

In a second step, each cluster was analyzed separately with a principal component analysis (PCA) run with data from experiments to evaluate tolerance to acidic pH and bile salts, hydrophobicity, auto-aggregation and bile salt deconjugation of isolates forming each cluster.

Evaluation of antibiotic susceptibility

Isolates selected as having the most promising probiotic-related characteristics in PCA were examined for antibiotic susceptibility with a standard disc diffusion method [27,28]. Tested antibiotics were ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), clindamycin (2 µg), tetracycline (30 µg), vancomycin (30 µg), gentamicin (10 µg), tobramycin (10 µg) and streptomycin (300 µg). Susceptibility of isolates to antibiotics was measured according to the diameter of growth inhibition zones based on standard criteria [28], being classified as susceptible (S) or resistant (R).

Evaluation of antagonistic activity against pathogens

Isolates selected after antibiotic susceptibility tests were assessed for their antagonistic activity against pathogens with a previously described agar spot method [12] using *Escherichia coli* (INCQS 00266, originally ATCC 7644) and *Listeria monocytogenes* (INCQS 00266, originally ATCC 7644) as indicator microorganisms. Occurrence of antagonistic activity was considered when growth inhibition zones around each point (velar zone) with diameter of >1 mm were found [12].

Identification of selected isolates by sequence analysis of 16S-rRNA gene

Bacterial genomic DNA was extracted with a magnetic beads methodology with a proprietary protocol (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil). For detection of 16S-rRNA V3/V4 region, the following primers were used: 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) [29] and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) [30]. PCR was performed with MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) and reactions with V2 kit, 300 cycles and single-end sequencing. Sequences were analyzed with a proprietary pipeline (Neopropecta Microbiome Technologies). All reads were individually submitted to a quality filter based on sum of DNA base probability errors, allowing a maximum of 1% of accumulated errors. DNA sequences corresponding to Illumina adapters were removed. The resulting sequences with 100% identity were clustered and used for taxonomic identification

with accurate 16S-rRNA sequences database NeoRef (Neoprosperta Microbiome Technologies). Bacterial identification was assumed when query sequence had >99% similarity to 16S-rRNA gene sequence.

Survival of selected isolates in different food matrices

The capability of selected LAB isolates of surviving in commercial whole and additive/preservative-free apple and orange juice (Natural One™, Jarinú, São Paulo, Brazil), beef stew, mixed vegetable puree (Nestlé Brasil, São José do Rio Pardo, São Paulo, Brazil) and UHT milk (Camponesa) during 28 days of refrigeration storage was evaluated with measurements of viable counts and cell physiological states with multiparametric flow cytometry. The food matrices were sterilized with an autoclave (121 °C, 1.1 atm, 15 min) before use in experiments.

A 1 mL-aliquot of tested LAB isolate cultivated overnight in MRS broth under anaerobiosis was inoculated in 100 mL of each examined food matrix (final viable counts of approximately 7 log CFU/mL) and stored (4 ± 0.5 °C). On day 7, 14, 21 and 28 of storage, a 1 mL-aliquot of each food matrix was serially diluted in sterile peptone water (1:9, 10^{-1} - 10^{-5}) and a 100 µL-aliquot was plated on MRS agar. After an anaerobic incubation of 48 h at 37 °C, the visible colonies were counted and results were expressed as log CFU/mL.

Simultaneously, a staining procedure with propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, 10 µg/mL) and carboxyfluorescein diacetate (cFDA, Sigma-Aldrich, 2.5 µg/mL) was done on each storage period to measure cytoplasmic membrane integrity and enzymatic activity of inoculated cells, respectively. Staining procedures, data acquisition and analysis were done with a flow cytometer (BD Accuri C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) [31,32]. Cell subpopulations characterized as PI-cFDA⁺ were considered non-permeabilized cells with enzymatic activity (living cells); PI+cFDA⁻ were considered permeabilized cells without enzymatic activity (dead cells); and PI+cFDA⁺ were considered permeabilized cells with enzymatic activity (injured cells). These experiments were done in triplicate in three independent repetitions. ANOVA followed by Tukey's test was used to determine significant differences among results (average $\pm$ standard deviation). A P-value of <0.05 was considered as significant. Statistical analysis was done with RStudio software [33].

Results

Preliminary identification of LAB isolates

A total of 336 isolates were recovered from apple, banana, grape and orange samples. Ninety-three isolates were presumptively classified as LAB based on their phenotypic characteristics, being 21 from apple, 16 from banana, 30 from grape and 26 from orange. MALDI-ToF MS technique reached a secure genus identification of 18 isolates, being 6 pre-identified as *Lactobacillus* spp. and 12 as *Enterococcus* spp., and reached a probable genus identification of 35 isolates, being 11 isolates pre-identified as *Lactobacillus* spp. and 24 as *Enterococcus* spp. MALDI-ToF MS technique pre-identified 8 and 9 isolates as “like possible” *Enterococcus* spp. and *Lactobacillus* spp., respectively. A no secure identification score was reached for 23 isolates (Supporting information, Table S1).

Safety analysis

Twenty-seven out from the 93 examined (preliminarily identified) LAB isolates did not pass in safety tests, remaining 66 isolates to be included in further experiments. All excluded isolates were positive for β -haemolysis activity. Eleven isolates had mucinolytic activity, 18 isolates had positive gelatinase activity and 14 isolates had positive DNase activity. None of the examined isolates was positive for histamine and cadaverine production.

Selection of isolates based on *in vitro* technological and probiotic-related properties

Cluster analysis allowed to divide the 66 examined LAB isolates into 3 homogeneous groups or clusters based on their probiotic-related properties (Fig. 1 and Supporting information, Table S2). Cluster 1 had 35 isolates, cluster 2 had 6 isolates and cluster 3 had 25 isolates. A PCA was run for each group of isolates forming cluster 1, 2 and 3 separately. Isolates grouped in cluster 1 and located at the upper right quadrant had the better results in experiments to evaluate acidic pH tolerance, bile salt tolerance and bile salt deconjugation, while isolates located at the upper left quadrant had the better results in experiments to measure hydrophobicity and autoaggregation (Fig. 2A-B). Isolates grouped in cluster 2 and located at the lower left quadrant had the better results in experiments to measure hydrophobicity, while isolates located at the upper left side had the better results in experiments to measure autoaggregation, however, the better results in experiments to evaluate acidic pH tolerance, bile salt tolerance and bile salt deconjugation were located in both right quadrant (Fig. 2C-D). Isolates grouped in cluster 3 and located at the upper right quadrant had the better results in experiments to measure bile salt tolerance and bile salt deconjugation, while isolates located at the lower right quadrant had the better results in experiments to measure autoaggregation and hydrophobicity, whereas the isolates located in the left quadrants had better results of tolerance at low pH (Fig. 2E-F).

Isolates 10, 24 and 32 from cluster 1, isolates 2, 25 and 54 from cluster 2 and isolates 6, 34 and 62 from cluster 3 had overall the best performances, being selected for use in further investigations.

Antibiotic susceptibility of selected LAB isolates and antagonistic activity against pathogens

All the 9 selected LAB isolates were sensitive to gentamycin, tobramycin and vancomycin. Isolates 10 and 32 from cluster 1 and isolates 2 and 25 from cluster 2 were sensitive to all tested antibiotics. The other 5 examined isolates were resistant to at least 2 out the 9 tested antibiotics (Supporting information, Table S3). Based on these results, only the isolates sensitive to all examined antibiotics were included in further experiments to investigate their antagonistic activity against pathogens and measure their survival in different food matrices. These 4 remaining LAB isolates had antagonistic activity against *E. coli* and *L. monocytogenes* (Supporting information, Table S4).

The isolate 32 was identified by 16S-rRNA sequencing as being *Lactobacillus brevis* (recently reclassified as *Levilactobacillus brevis*) and isolates 2, 10 and 25 were identified as being *Lactobacillus* sp. or recently amended genera. These Isolates 2, 10 and 25 had 100% of similarity with the species *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus* (recently reclassified as *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactiplantibacillus paraplantarum* and *Lactiplantibacillus pentosus*, respectively). Sequences were deposited into Genbank nucleotide sequence database under accession numbers MT903271, MT903273, MT903274 and MT903272, respectively. The genera of these 4 isolates identified by 16S-rRNA sequencing agreed with MADI-ToF MS pre-identification.

Survival of selected isolates in different food matrices

Results of survival, as measured by viable counts and cell physiological states, of isolates 2, 10, 25 and 32 in different food matrices during 28 days of refrigeration storage are shown in Figure 3 and Table 2, respectively. In most cases, the 4 selected isolates had viable counts of >6 log CFU/mL in apple and orange juice, meat stew, vegetable puree and UHT milk during the measured storage period, with a reduction in viable counts of ≤ 1.2 log CFU/mL over time. Viable counts on day 28 of refrigeration storage were in the range of 6.1 ± 0.3 to 8.2 ± 0.5 CFU/mL.

Results of flow cytometry showed that selected isolates had overall high sizes of PI-cFDA+ cell subpopulations (metabolically active living cells) during the measured storage period, with values in the range of 26.4 ± 0.5 to $72.1 \pm 0.7\%$ on day 28 of storage. The isolates had overall an increase in sizes of PI-cFDA+ cell subpopulations in apple and orange juice and meat stew on

day 28 of storage, with exception of isolate 25 in orange juice and meat stew. Only the isolate 32 had an increase in sizes of PI-cFDA+ cell subpopulation in vegetable puree ($23.6 \pm 0.6 - 38.1 \pm 0.5\%$) during storage, while this subpopulation remained similar or decreased for the other isolates. The 4 isolates had a decrease in sizes of PI-cFDA+ cell subpopulations ($69.7 \pm 0.3 - 35.3 \pm 0.8$) in UHT milk during storage. The sizes of PI+cFDA- cell subpopulations (dead cells) for all isolates increased during storage in meat stew, vegetable puree and UHT milk, which were low and ranged from 4.7 ± 0.2 to $8.6 \pm 0.9\%$ on day 28 of storage.

The sizes of PI+cFDA+ cell subpopulations (injured cells) were increased ($19.2 \pm 0.4 - 72.8 \pm 0.9\%$) for all isolates in meat stew, vegetable puree and UHT milk on day 28 of storage, while were decreased in apple and orange juice ($4.3 \pm 0.2 - 39.7 \pm 1.3\%$). Although the alterations in sizes of PI+cFDA+ cell subpopulations in apple and orange juice during storage were variable among isolates, their sizes on day 28 of storage were low and ranged from 2.7 ± 0.3 to $7.5 \pm 0.5\%$.

Discussion

Most of the isolates recovered from apple, banana, grape and orange samples and presumptively classified as LAB were pre-identified by MALDI-ToF MS profiling as *Lactobacillus* spp. or *Enterococcus* spp. Although the autochthonous microflora of plants has been characterized as an extremely complex microbial community [Szutowska 2020], lactobacilli and enterococci have been ordinarily identified in autochthonous LAB microbiota of fruit [18, 34, 35], being *Lactobacillus* the genus most commonly found as prevalent in fruit [18, 36, 37].

The MALDI-ToF MS technique was used as a pre-identification step because it has been considered a reliable method for LAB identification [12, 38] Additionally, MALDI-ToF MS technique enables a comparison among protein profile of bacterial isolates of interest with previously known protein profile of bacterial species to discard subsequent experiment with pre-identified pathogens [13,19], with a practical application to search for probiotic isolates [12, 24]. Some studies in available literature have shown the performance and reproducibility of MALDI-ToF MS to identify LAB species from food sources [19, 24, 38, 39], including fruit [12, 40]. The application of MALDI-ToF MS profiling to LAB identification has relied on some advantages, such as high-throughput, robustness, recognizing-based method, fast tendency test, ease of use and low cost per test [38, 41], which could support phenotypic methods for fast identification in a first characterization step of LAB culturable community in foods [41]. However, MALDI-ToF MS profiling for bacterial identification could have some drawbacks, including a method with relative low analytical sensitivity ($\pm 10^5 - 10^6$ bacteria/deposit) and a restrict content of available MS-profile database [41, 42], which could be associated with the number of isolates preliminarily

identified as LAB in this study but not reaching a secure identification level in MALDI-ToF MS profiling.

The LAB isolates with positive results to DNase, gelatinase, hemolytic and mucinolytic activity or production of biogenic amines were excluded in this study, since these physiological features have been ordinary recognized as virulence attributes found in pathogens and not desirable in probiotics [27,43, 44, 45]. Based on the results of proteolytic activity, production of diacetyl and EPS and NaCl tolerance, it was possible to divide the isolates into homogeneous groups. Proteolytic activity leads to production of peptides and free amino acids, which can impart specific flavor and aroma characteristics to foods [46]. Diacetyl production is related to butter-like aroma and sweet taste development, while EPS production affects moisture content besides of imparting a wet mouth feeling in foods [47]. Salt tolerance indicates the capability of NaCl concentrations of affecting cell viability and functionality of probiotics in foods [6]. Acidification capacity in probiotics can be an advantage to inhibit pathogens [24].

Cluster analysis must be used as a qualitative mean to indicate statistical groups with a typical behavior in characteristics of interest [16]. PCA combines a qualitative measure of data diversity (ordination approach) represented as a dispersion of examined isolates in factorial space, giving an overview of the most important factors account for the dispersion [16]. A total of 9 LAB isolates, being 3 from each cluster 1, 2 and 3, were selected as having the most promising probiotic-related characteristics (tolerance to acidic pH and bile salts, hydrophobicity, auto-aggregation and bile salt deconjugation) based on a PCA analysis. Survival to conditions mimicking the gastrointestinal tract, specifically under acidic pH and bile salt presence, are important tests to select probiotic isolates [17]. Cellular hydrophobicity and auto-aggregation are characteristics linked to ability of probiotics to adhere to intestinal cells and colonize gastrointestinal tract [47]. Ability to hydrolyze bile salts is an important feature to protect probiotics from conjugated bile salt toxic effects [48].

Some earlier studies have reported probiotic properties from LAB isolates from fruit or their by-products using different protocols based on in vitro and/or in vivo experiments [12, 13, 17, 36, 37]; however, none of these studies have evaluated jointly apple, banana, grape and orange as potential source of probiotics. The novelty of this study was also to reach a selected group of LAB isolates with probiotic aptitudes from different fruit sources using a multivariate analysis based on the interpretation of data of the performance of a large number of fruit-derived LAB isolates in experiments to measure technological and functional probiotic-related properties. Benefits of this approach should be the reduction of data set complexity and

possibility of using traditional techniques to characterize a large number of LAB isolates in regards of their potential to be exploited as probiotics [16,49,50].

Five of the selected LAB isolates had resistance to some antibiotics. Considering the recommendation that bacterial isolates with resistance to antibiotics should not be used as probiotics in foods while the genetic nature of demonstrated resistance has not been clarified [51], only the 4 isolates sensitive to all tested antibiotics were examined for their antagonistic activity against pathogens and survival in different food matrices. The nature of the resistance to antibiotics of the 5 excluded LAB isolates warrants further analysis before any of them could be considered safe for use in foods. The 4 remaining selected LAB isolates had antagonistic activity against pathogens. The capability of producing antimicrobial compounds, such as organic acids, short-chain fatty acids, hydrogen peroxide, diacetyl, carbon dioxide, acetoin, peptides and bacteriocins, is among the most important functional properties for probiotics. Production of antimicrobial compounds by probiotics associated with harsh conditions found in digestive tract can prevent the survival of pathogens and favor the effective competitive exclusion by probiotics [27,51]. These isolates were identified with 16S-rRNA gene sequencing as being *L. brevis* and *Lactobacillus* sp. (or amended genera) [52]. Additional genetic and physiological information could be recommended, such as guanine – cytosine content, saccharide fermentation capacity and DNA relationship values, to clarify the identification of these isolates [18].

The conditions found in some food products should cause physiological damage in probiotic cells, being important to select probiotic isolates/strains capable of tolerating these conditions or even of adapting and recovering from induced damage. Flow cytometry has been successfully used to investigate changes in viability and physiological status of probiotic cells in foods, giving valuable information on the heterogeneity of viable and non-viable subpopulations in delivery matrices [53,54]. The efficacy of probiotics to promote health benefits on host has been commonly relied on the number of their viable and metabolically active cells per gram or milliliter of the delivery food matrix at the moment of consumption [9,55]. The high viable counts and low percentage of non-viable (dead) cells of selected isolates in apple and orange juice, meat stew, vegetable puree and UHT milk indicate their ability to survive during refrigeration storage when incorporated directly as wet cells in a variety of delivery matrices, including plant and animal origin foods, which should be a distinguished feature of the most promising selected LAB isolates from fruit. Finally, the higher survival rates and different probiotic-related and technological characteristics found for these selected isolates should direct their possible incorporation in different food formulations with plant or animal origin ingredients to reach distinct added-value and quality-related characteristics.

Conclusion

The results showed that apple, banana, orange and grape are potential sources of LAB with promising aptitudes to be exploited for a possible probiotic use. These isolates had *in vitro* technological characteristics that could direct their incorporation into formulations to develop probiotic foods with distinct characteristics. The 4 most promising LAB isolates were identified as being *L. brevis* and *Lactobacillus* spp and had ability to keep high viable counts and active physiological functions in different plant and animal origin foods during refrigeration storage. The most promising selected LAB isolates should be included in further *in vivo* investigations using cell lines or animal models to advance in definition of their health-promoting effects and confirm their potential for application as probiotics.

Acknowledgements Authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for partial funding of this research (Finance code 001) and Center for Strategic Technologies for Northeast (CETENE, Brazil) for support in identification of LAB isolates with MALDI-ToF MS.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Author contribution Conceptualization: N.A. Rodrigues, E.F. Garcia, E.L. de Souza. Data curation; Formal analysis: N.A. Rodrigues, E.F. Garcia, E.L. de Souza. Funding acquisition: E.L. de Souza. Methodology: N.A. Rodrigues, E.F. Garcia, E.L. de Souza. Project administration: E.L. de Souza. Supervision: E.F. Garcia, E.L. de Souza. Validation: N.A. Rodrigues, E.F. Garcia. Writing - original draft: N.A. Rodrigues, E.F. Garcia, E.L. de Souza. Writing - review & editing: E.L. de Souza.

References

1. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2006). Probiotics in food, World Health Organization, Third Edition.
<https://doi.org/10.1201/9781420009613.ch16>
2. Rajoka MSR, Mehwish HM, Siddiq M, Haobin Z, Zhu J, Yan L, Shao D, Xu X, Shi J (2017) Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. LWT - Food Sci Technol 84: 271–280.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.055>

3. Ebel B, Lemetais G, Beney L, Cachon R, Sokol H, Langella P, Gervais P (2014) Impact of probiotics on risk factors for cardiovascular diseases. A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 54: 175–189. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.579361>
4. Papadimitriou K, Zoumpopoulou G, Foligné B, Alexandraki V, Kazou M, Pot B, Tsakalidou E (2015) Discovering probiotic microorganisms: *In vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Front Microbiol* 6: 1–29. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00058>
5. Rodríguez LGR, Mohamed F, Bleckwedel J, Medina R, De Vuyst L, Hebert EM, Mozzi F (2019) Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina. *Front Microbiol* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01091>
6. Gregoret V, Perezlindo MJ, Vinderola G, Reinheimer J, Binetti A (2013) A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. *Food Microbiol* 34: 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.004>
7. Olvera-García M, Sanchez-Flores A, Quirasco Baruch M (2018) Genomic and functional characterization of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 2251–2267. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8765-3>
8. Panghal A, Janghu S, Virkar K, Gat Y, Kumar V, Chhikara N (2018) Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. *Food Biosci* 21: 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.003>
9. Valero-Cases E, Cerdá-Bernad D, Pastor J-J, Frutos M-J (2020) Non-dairy fermented beverages as potential carriers to ensure probiotics, prebiotics, and bioactive compounds arrival to the gut and their health benefits. *Nutrients* 12: 1666. <https://doi.org/10.3390/nu12061666>
10. Perricone M, Bevilacqua A, Corbo MR, Sinigaglia M (2014) Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiol* 38: 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.006>
11. Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M (2013) Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol* 33: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>
12. Garcia EF, Luciano WA, Xavier DE, da Costa WCA, Oliveira KS, Franco OL, de Moraes Júnior MA, Lucena BTL, Picão RC, Magnani M, Saarela M, de Souza EL (2016) Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential

- probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. *Front Microbiol* 7: 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>
13. Samedi L, Charles AL (2019) Isolation and characterization of potential probiotic lactobacilli from leaves of food plants for possible additives in pellet feeding. *Ann Agric Sci* 64: 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2019.05.004>
 14. Verón HE, Di Risio HD, Isla MI, Torres S (2017) Isolation and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from *Opuntia ficus-indica* fruits that grow in Northwest Argentina. *LWT - Food Sci Technol* 84: 231–240.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.058>
 15. Corbo M.R., Bevilacqua A., Speranza B., Gallo M., Campaniello D., Sinigaglia M. (2017). Selection of wild lactic acid bacteria for sausages: Design of a selection protocol combining statistic tools, technological and functional properties. *LWT - Food Sci Technol* 81: 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.051>
 16. Speranza B, Racioppo A, Beneduce L, Bevilacqua A, Sinigaglia M, Corbo MR (2017) Autochthonous lactic acid bacteria with probiotic aptitudes as starter cultures for fish-based products. *Food Microbiol* 65: 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.010>
 17. de Albuquerque TMR, Garcia EF, Araújo AO, Magnani M, Saarela M, de Souza EL (2018) *In vitro* characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics Antimicrob Proteins* 10: 704–716.
<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
 18. Chen YS, Liao YJ, Lan YS, Wu HC, Yanagida F (2017). Diversity of lactic acid bacteria associated with banana fruits in Taiwan. *Curr Microbiol* 74: 484–490.
<https://doi.org/10.1007/s00284-017-1213-2>
 19. Amorim JC, Piccoli RH, Duarte WF (2018) Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Res Int* 107: 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.054>
 20. American Public Health (APHA) (2015). Compendium for the microbiological examination of foods. Washington, DC: American Public Health.
 21. Santini C, Baffoni L, Gaggia F, Granata M, Gasbarri R, Di Gioia D, Biavati B (2010) Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *Int J Food Microbiol* 141: S98–S108.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.039>
 22. Monteagudo-Mera A, Rodríguez-Aparicio L, Rúa J, Martínez-Blanco H, Navasa N, García-Armesto MR, Ferrero MA, Ángel M (2012) *In vitro* evaluation of physiological

- probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J Funct Foods* 4: 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.014>
23. Domingos-Lopes MFP, Stanton C, Ross PR, Dapkevicius MLE, Silva CCG (2017) Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiol* 63: 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.014>
 24. Bujnakova D, Strakova E (2017) Safety, probiotic and technological properties of lactobacilli isolated from unpasteurized ovine and caprine cheeses. *Ann Microbiol* 67: 813–826. [10.1007/s13213-017-1310-2](https://doi.org/10.1007/s13213-017-1310-2)
 25. Santos KMO, Vieira ADS, Rocha CRC, do Nascimento JCF, de Souza Lopes, AC, Bruno LM, Carvalho JDG, de Melo Franco BDG, Todorov SD (2014) Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. *Ann Microbiol* 64: 1463–1471. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0789-4>
 26. Todorov SD, Botes M, Guigas C, Schillinger U, Wiid I, Wachsman MB, Holzapfel WH, Dicks LMT (2008) Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 104: 465–477. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03558.x>
 27. Awasti N, Tomar SK, Pophaly SD, Poonam P, Lule VK, Singh TP, Anand S (2016). Probiotic and functional characterization of bifidobacteria of Indian human origin. *J Appl Microbiol* 120: 1021–1032. <https://doi.org/10.1111/jam.13086>
 28. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2019). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Newsl M100*, 49. [https://doi.org/10.1016/s0196-4399\(01\)88009-0](https://doi.org/10.1016/s0196-4399(01)88009-0)
 29. Wang Y, Qian PY (2009) Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
 30. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert JA, Smith G, Knight R (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6: 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
 31. Paparella A, Taccogna L, Aguzzi I, Chaves-Lopez C, Serio A, Marsilio F, Suzzi G (2008) Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Cont* 19: 1174–1182. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.01.002>

32. de Souza Pedrosa GT, de Souza EL, de Melo ANF, da Cruz Almeida ET, de Sousa Guedes JP, de Carvalho RJ, Pagán R, Magnani M (2020) Physiological alterations involved in inactivation of autochthonous spoilage bacteria in orange juice caused by *Citrus* essential oils and mild heat. *Int J Food Microbiol* 334: 108837. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108837>
33. R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
34. Francesca N, Settanni L, Sannino C, Aponte M, Moschetti G (2011) Ecology and technological capability of lactic acid bacteria isolated during Grillo grape vinification in the Marsala production area. *Ann Microbiol* 61: 79–84. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0109-1>
35. Szutowska J (2020) Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review. *Eur Food Res Technol* 246: 357–372. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03425-7>
36. Chandel D, Sharma M, Chawla V, Sachdeva N, Shukla G (2019) Isolation, characterization and identification of antigenotoxic and anticancerous indigenous probiotics and their prophylactic potential in experimental colon carcinogenesis. *Nature Sci Rep* 9: 14769. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51361-z>
37. Khanna S, Bishnoi M, Kondepudi KK, Shukla G (2020) Isolation, characterization and anti-inflammatory mechanism of probiotics in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *World J Microbiol Biotechnol.* 36(5):74. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02852-z>.
38. Španová A, Dráb V, Turková K, Špano M, Burdychová R, Šedo O, Tková DS, Rada V, Rittich B (2015) Selection of potential probiotic *Lactobacillus* strains of human origin for use in dairy industry. *Eur Food Res Technol* 7:1 – 9. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2511-1>
39. Angelakis E, Million M, Henry M, Raoult D (2011) Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Food Sci* 76: 568-572. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02369.x>
40. Barache N, Ladjouzi N, Belguesmia Y, Bendali F, Drider D (2020) Abundance of *Lactobacillus plantarum* Strains with Beneficial Attributes in Blackberries (*Rubus* sp.), Fresh Figs (*Ficus carica*), and Prickly Pears (*Opuntia ficus-indica*) Grown and Harvested in Algeria. *Probiotics & Antimicro Prot* 12:1514–1523. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09632-z>

41. Nacef M, Chevalier M, Chollet S, Drider D, Flahaut C (2017) MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *Int J Food Microbiol* 247:2–8.
<http://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>.
42. Paauw A, Jonker D, Roeselers G, Heng JME, Mars-Groenendijk RH, Trip H, Molhoek EM, Jansen HJ, Plas JV, de Jong AL, Majchrzykiewicz-Koehorst JA, Speksnijder AGCL (2015) Rapid and reliable discrimination between *Shigella* species and *Escherichia coli* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol* 305: 446–452.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.04.001>.
43. Divisekera DMWD, Samarasekera JKRR, Hettiarachchi C, Gooneratne J, Choudhary MI, Gopalakrishnan S (2019) Isolation and identification of lactic acid bacteria with probiotic potential from fermented flour of selected banana varieties grown in Sri Lanka. *J Natl Sci Found Sri Lanka* 47: 3–16. <https://doi.org/10.4038/jnsfsr.v47i1.8922>
44. Devi SM, Aishwarya S, Halami PM (2016) Discrimination and divergence among *Lactobacillus plantarum*-group (LPG) isolates with reference to their probiotic functionalities from vegetable origin. *Syst Appl Microbiol* 39: 562–570.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.09.005>
45. Mathew S, Vijay S, Potty VP (2017) Assessment of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from curd and its application using fruit juice. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 6: 282–289. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.034>
46. Teixeira JS, Seeras A, Sanchez-Maldonado AF, Zhang C, Su MSW, Gänzle MG (2014) Glutamine, glutamate, and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiol* 42: 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.015>
47. Fujimoto A, Ito K, Narushima N, Miyamoto T (2019) Identification of lactic acid bacteria and yeasts, and characterization of food components of sourdoughs used in Japanese bakeries. *J Biosci Bioeng* 127: 575–581.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.014>
48. Dlamini ZC, Langa RLS, Aiyegoro OA, Okoh AI (2019) Safety evaluation and colonization abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11: 397–402. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9430-y>
49. Solieri L, Bianchi A, Mottolèse G, Lemmetti F, Giudici P (2014) Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. *Food Microbiol* 38: 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.10.003>

50. Martorana A, Giuffrè AM, Capocasale M, Zappia C, Sidari R (2018) Sourdoughs as a source of lactic acid bacteria and yeasts with technological characteristics useful for improved bakery products. *Eur Food Res Technol* 244: 1873–1885.
<https://doi.org/10.1007/s00217-018-3100-x>
51. EFSA (European Food Safety Authority) (2012) Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA J* 10: 1–10.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2682>
52. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 70:2782–2858.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
53. International Standards Organization, (ISO), International Dairy Federation (IDF) (2015). Milk and milk products - Starter cultures, probiotics and fermented products - Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry. *Int Stand ISO 193442015 IDF* 232: 20.
54. Wilkinson MG (2018) Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. *Trends Food Sci Technol* 78: 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.006>
55. Tripathi MK, Giri SK (2014) Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J Funct Foods* 9: 225–241.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

Figure captions

Figure 1 Cluster analysis run of lactic acid bacteria isolates from fruit. Differences were computed as dissimilarities and results of assays of acidification capacity, proteolytic activity and exopolysaccharide and diacetyl production were used as input variables. Dashed line represents the cut-off point to detection of clusters.

Figure 2 Principal Component Analysis (PCA) run for lactic acid bacteria isolates of cluster 1 (A – B), cluster 2 (B –C) and cluster 3 (D – E) with both case projection (distribution of isolates in factorial space) and variable projection to acid tolerance, survival with 0.5% bile salts, hydrophobicity, auto-aggregation capacity and bile salt hydrolase activity. Map of the location of variables in factorial space (A, C and D). Principal Component Analysis (PCA) diagram for lactic acid bacteria isolates (B, D and E).

Figure 3 Viable counts (CFU/mL) of the 4 selected isolates selected as having the most promising probiotic-related characteristics in different foods during 28 days of refrigeration storage (4 ± 0.5 °C).

Table 1 Qualitative codes used for multivariate analysis (Cluster and Principal Component Analysis).

Qualitative code	Proteolytic activity	Diacetyl production	Exopolysaccharide production	Acidification capacity	Acid tolerance
0	Negative	None	<25%	<1	<25%
1	Positive	Weak	25 - 75%	1 - 1.5	25-75%
2	-	Strong	>75%	>1.5	>75%

(-): Na: Not applicable.

Table 2 The size (%) of subpopulations of 4 selected isolates as having the most promising probiotic-related characteristics in different foods during 28 days of refrigeration storage (4 ± 0.5 °C).

Isolates	Day of storage	Apple juice			Orange juice			Beef stew			Vegetable puree			UHT milk		
		PI-cFDA+	PI+cFDA+	PI+cFDA-	PI-cFDA+	PI+cFDA+	PI+cFDA-	PI-cFDA+	PI+cFDA+	PI+cFDA-	PI-cFDA+	PI+cFDA+	PI+cFDA-	PI-cFDA+	PI+cFDA+	PI+cFDA-
Isolate 2	7	13.3±0.4 ^D	88.6±0.7 ^A	6.4±0.4 ^B	45.4±0.5 ^B	39.4±0.6 ^A	1.7±0.1 ^B	32.9±0.9 ^B	4.6±0.8 ^B	3.5±0.1 ^B	29.7±0.5 ^A	57.1±0.8 ^B	3.8±0.4 ^D	69.3±0.6 ^A	3.7±0.2 ^D	4.1±0.1 ^C
	14	17.7±0.5 ^C	86.0±0.9 ^A	3.0±0.8 ^D	34.9±0.4 ^C	39.8±0.5 ^A	2.2±0.2 ^A	27.2±0.4 ^C	5.8±1.2 ^B	3.7±0.5 ^B	25.6±0.4 ^C	11.6±0.5 ^C	45.5±1.0 ^A	50.5±0.5 ^B	5.5±0.5 ^C	18.7±0.7 ^A
	21	20.9±0.9 ^B	81.7±0.5 ^B	4.9±0.6 ^C	71.4±0.8 ^A	12.3±0.7 ^B	2.4±0.2 ^A	19.5±0.7 ^D	6.3±0.9 ^B	3.7±0.3 ^B	27.6±0.6 ^B	10.7±0.4 ^C	11.2±0.6 ^C	44.9±0.7 ^C	7.8±0.3 ^B	4.5±0.2 ^B
	28	39.7±0.8 ^A	26.2±1.0 ^C	7.5±0.5 ^A	72.1±0.7 ^A	5.6±0.8 ^C	2.7±0.3 ^A	44.2±0.6 ^A	28.0±1.0 ^A	12.0±0.5 ^A	26.4±0.5 ^C	72.8±0.9 ^A	12.7±0.3 ^B	35.3±0.8 ^D	65.9±1.1 ^A	4.7±0.2 ^B
Isolate 10	7	16.1±0.4 ^D	72.4±0.4 ^C	9.3±1.2 ^A	64.2±1.7 ^B	13.9±0.9 ^C	1.7±0.8 ^B	23.3±0.5 ^D	5.0±0.3 ^D	5.4±0.7 ^B	28.6±0.2 ^A	50.8±0.3 ^B	2.5±0.2 ^D	69.7±0.3 ^A	1.8±0.3 ^D	3.1±0.8 ^C
	14	21.9±1.0 ^C	74.0±0.5 ^B	11.1±0.5 ^A	27.2±0.5 ^D	49.4±0.6 ^A	3.5±0.2 ^A	30.2±0.5 ^B	4.3±0.0 ^C	4.9±0.7 ^B	33.7±1.0 ^C	11.2±0.2 ^D	30.2±0.7 ^B	39.5±0.5 ^D	8.9±0.8 ^B	14.1±0.3 ^A
	21	26.8±1.2 ^B	78.6±1.2 ^A	10.9±0.4 ^A	45.3±0.7 ^C	31.4±1.1 ^B	2.7±0.4 ^B	27.5±0.8 ^C	6.8±0.2 ^B	6.1±0.8 ^B	28.4±0.4 ^A	15.7±0.4 ^C	43.8±2.0 ^A	42.3±0.8 ^B	5.7±0.5 ^C	14.1±0.4 ^A
	28	48.3±0.7 ^A	29.8±0.9 ^D	4.1±0.8 ^B	72.1±1.0 ^A	4.3±0.2 ^D	3.8±0.3 ^A	40.3±0.5 ^A	27.1±0.7 ^A	14.0±0.5 ^A	27.1±0.5 ^B	68.6±0.9 ^A	13.4±1.6 ^C	40.8±0.3 ^C	58.9±1.2 ^A	9.4±0.6 ^B
Isolate 25	7	13.5±0.5 ^D	87.1±1.1 ^A	7.8±0.3 ^A	65.7±0.7 ^A	19.8±0.6 ^C	0.6±0.2 ^B	32.3±0.6 ^A	0.6±0.3 ^B	2.9±0.2 ^C	29.1±0.6 ^C	8.1±0.5 ^D	2.6±0.4 ^D	62.9±0.9 ^A	1.7±0.3 ^D	4.5±0.5 ^D
	14	18.6±0.6 ^C	72.7±1.2 ^B	3.5±0.5 ^D	37.2±0.8 ^D	47.5±1.5 ^A	2.4±0.9 ^A	28.1±0.4 ^C	0.4±0.2 ^B	9.9±0.4 ^B	32.7±0.4 ^B	12.3±0.7 ^C	20.6±0.6 ^A	52.3±1.3 ^B	11.7±0.3 ^B	11.9±0.5 ^B
	21	30.0±1.0 ^B	52.7±0.3 ^C	6.7±0.3 ^B	49.4±1.4 ^C	22.3±1.3 ^B	3.5±0.4 ^A	31.1±0.3 ^B	0.7±0.4 ^B	10.1±0.3 ^B	35.2±0.5 ^A	16.0±0.8 ^B	7.1±0.9 ^C	43.6±0.6 ^C	10.3±0.5 ^C	14.3±0.6 ^A
	28	37.5±0.5 ^A	39.7±1.3 ^D	4.9±0.6 ^C	56.7±0.3 ^B	11.3±0.2 ^D	2.7±0.6 ^A	33.2±0.7 ^A	31.5±1.5 ^A	16.1±0.5 ^A	28.7±0.3 ^C	66.9±1.1 ^A	15.5±0.5 ^B	36.0±0.5 ^D	59.0±1.0 ^A	8.0±0.5 ^C
Isolate 32	7	17.3±0.3 ^D	87.4±1.1 ^A	4.2±0.6 ^D	47.9±1.4 ^C	28.6±1.6 ^B	3.8±0.3 ^B	25.5±0.7 ^C	4.3±0.3 ^B	3.0±0.6 ^D	23.6±0.6 ^D	3.0±0.4 ^C	3.5±0.5 ^D	59.2±1.1 ^A	1.9±0.4 ^C	5.7±0.3 ^D
	14	24.9±0.7 ^C	70.4±0.6 ^B	5.3±0.3 ^C	35.2±0.8 ^D	42.6±1.5 ^A	2.2±0.5 ^C	23.6±0.8 ^D	2.5±0.1 ^C	12.5±0.3 ^B	25.7±0.9 ^C	5.5±0.7 ^B	21.2±0.6 ^A	53.6±0.5 ^B	6.5±0.5 ^B	12.5±0.5 ^B
	21	28.7±0.8 ^B	61.4±0.9 ^C	12.4±1.2 ^A	65.7±0.4 ^A	14.5±0.7 ^D	5.3±0.4 ^A	33.5±0.4 ^B	3.8±0.0 ^C	10.6±0.5 ^C	34.1±0.8 ^B	6.3±0.5 ^B	6.9±0.4 ^C	40.0±0.7 ^C	7.6±0.6 ^B	15.4±0.4 ^A
	28	53.2±1.3 ^A	19.6±0.5 ^D	6.3±0.4 ^B	53.0±0.6 ^B	19.7±0.9 ^C	3.5±0.5 ^B	40.2±0.6 ^A	19.2±0.4 ^A	14.4±0.8 ^A	38.1±0.5 ^A	69.9±1.6 ^A	8.6±0.9 ^B	35.4±0.5 ^D	63.2±1.0 ^A	6.5±0.3 ^C

A –D: Different capital letters in the same column indicate significant difference for the same isolate and food matrix at different storage time periods, based on Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Cluster of lactic acid bacteria isolates from fruit

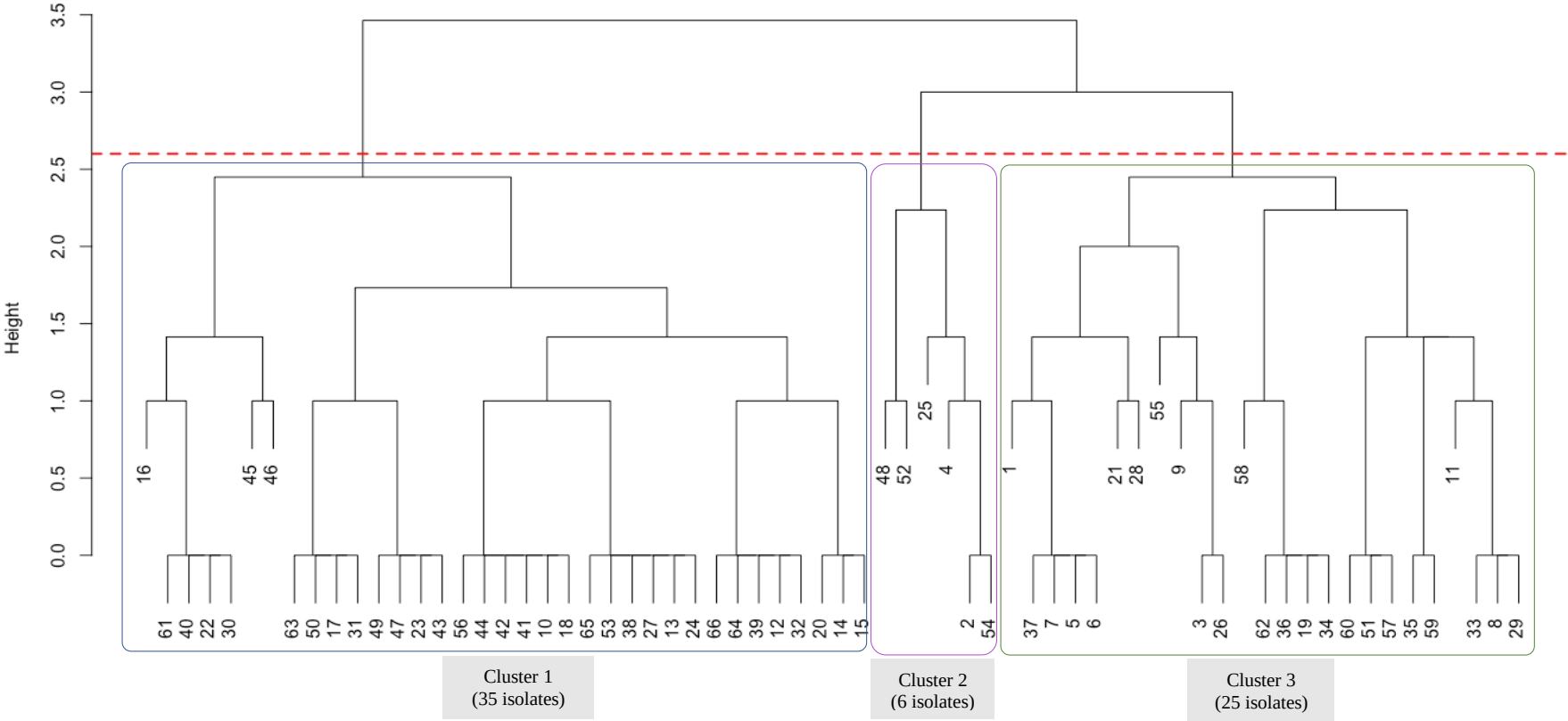


Figure 1

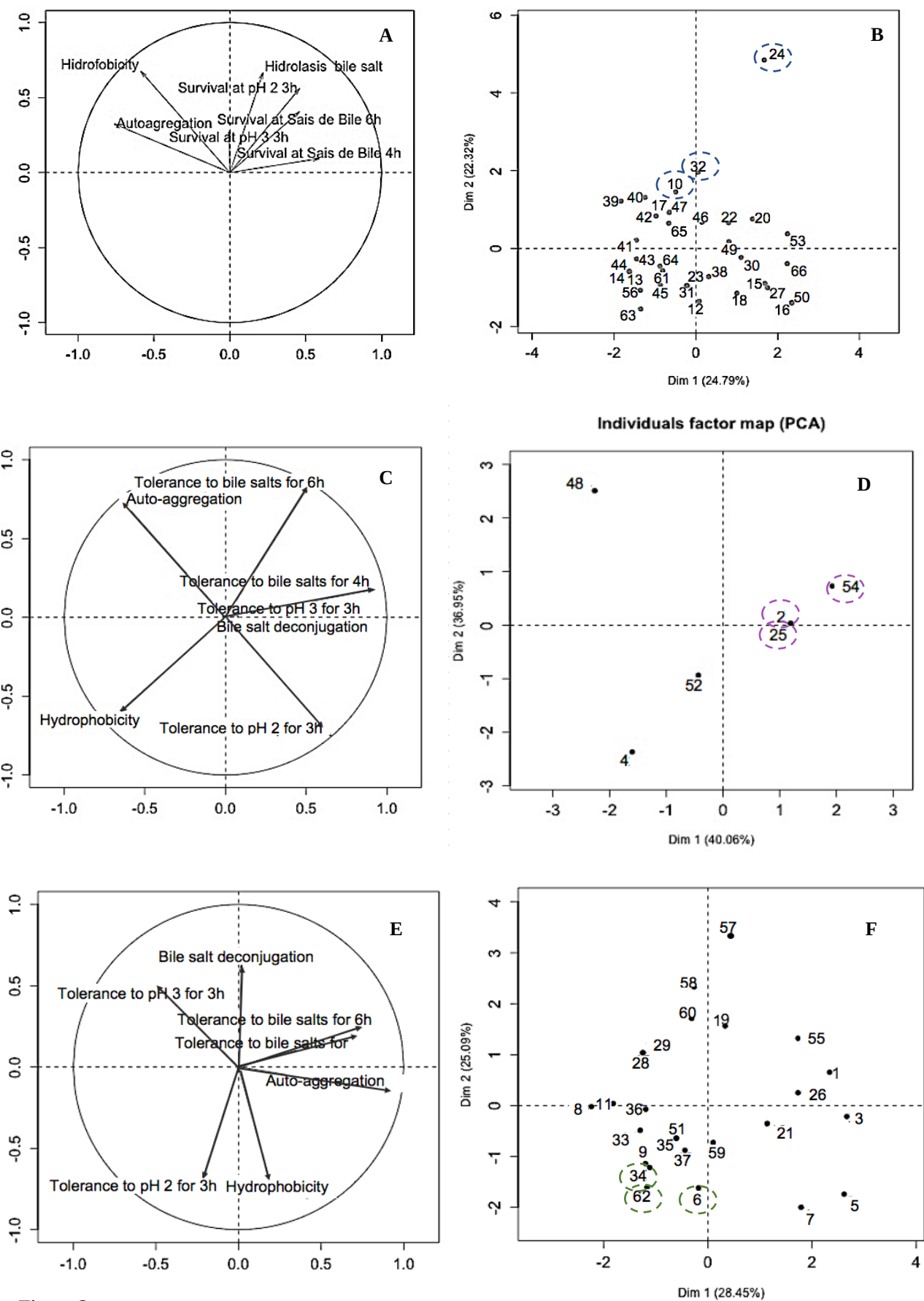


Figure 2

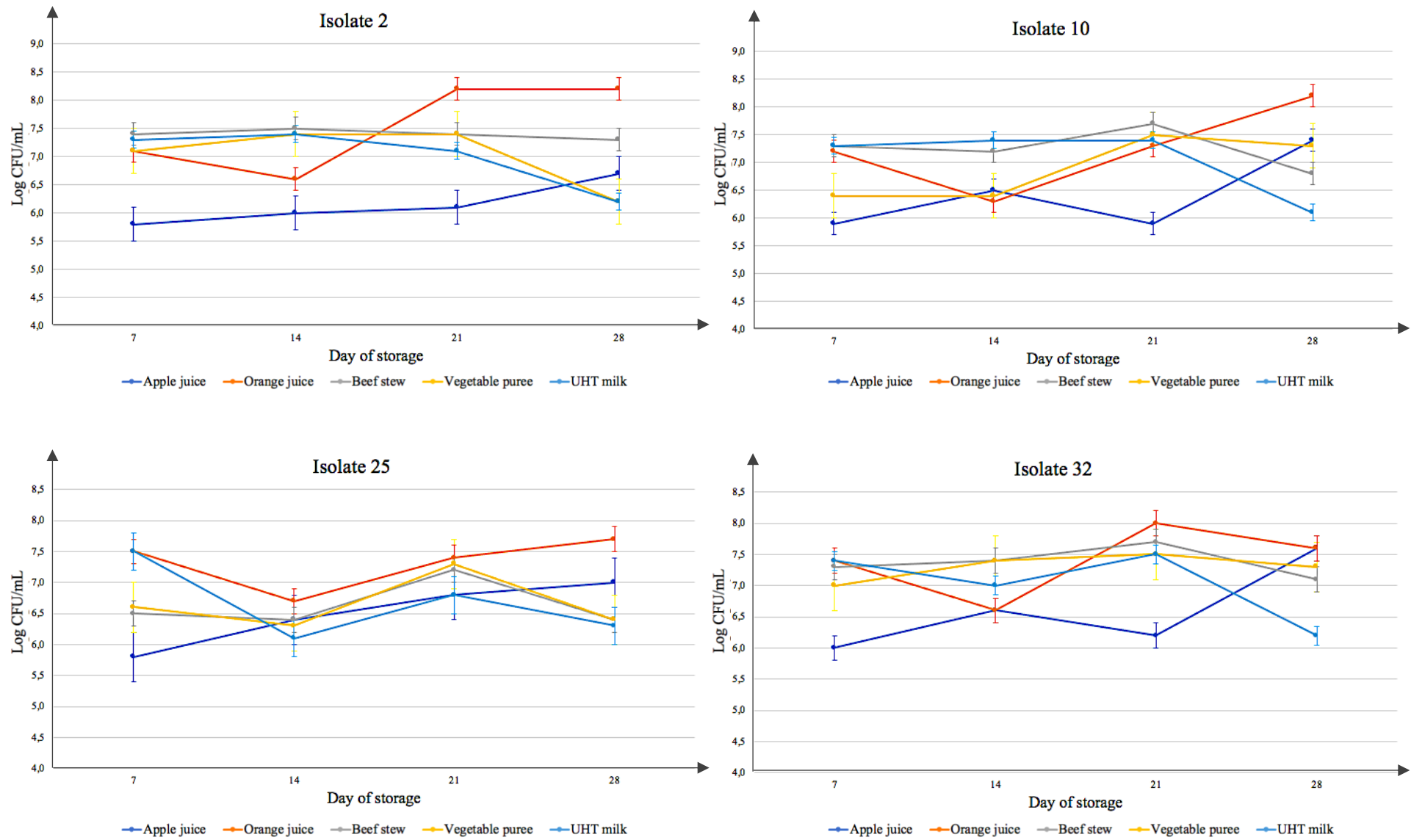


Figure 3.

Table S1. Initial identification and score of identification of lactic acid bacteria isolates from fruit with MALDI-ToF MS technique.

Fruit origin/Number of identified isolates and genera				
Fruit	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	Not identified	Total
Apple	13	3	5	21
Banana	0	8	8	16
Grape	20	5	5	30
Orange	11	10	5	26
Total	44	26	23	93
Score of identification/Number of identified isolates and genera				
Score of identification*	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	Not identified	Total
<1.7	8	9	Na	17
≥1.7 and ≤2.0	24	11	Na	35
≥2.0 and ≤2.3	12	6	Na	18
No score	Na	Na	23	23
Total	44	26	23	93

*BioTyper logs (score) ≥2.3 and ≤3.0 indicate a highly probable identification at species level; logs (score) ≥2.0 and <2.3 indicate secure genus identification and probable species identification; logs (score) ≥1.7 and <2.0 indicate probable genus identification; and logs (score) <1.7 indicate no significant similarity between unknown profile and database entries. Na: Not applicable.

Table S2. Technological characteristics of lactic acid bacteria isolates from fruit grouped in cluster 1, 2 and 3.

Cluster 1						
Fuit source	Identified genus	Total number of isolates	Isolates with acidification capacity	Isolates with exopolysaccharides production	Isolates with diacetyl production	Isolates with proteolytic activity
Apple	<i>Enterococcus</i>	7	7	7	7	7
	<i>Lactobacillus</i>	2	1	2	2	2
	Not identified	1	1	1	1	1
Banana	<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i>	6	6	6	6	6
	Not identified	2	2	2	1	2
Orange	<i>Enterococcus</i>	7	7	7	7	7
	<i>Lactobacillus</i>	5	3	5	5	5
	Not identified	1	1	1	1	1
Grape	<i>Enterococcus</i>	2	2	0	2	2
	<i>Lactobacillus</i>	2	2	2	2	2
	Not identified	0	0	0	0	0
Total	<i>Enterococcus</i>	16	16	14	16	16
	<i>Lactobacillus</i>	15	12	15	15	15
	Not identified	4	4	4	4	4
Cluster 2						
Fuit source	Identified genus	Total number of isolates	Isolates with acidification capacity	Isolates with exopolysaccharides production	Isolates with diacetyl production	Isolates with proteolytic activity
Apple	<i>Enterococcus</i>	2	1	2	2	2
	<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0	0
	Not identified	1	1	1	1	1
Banana	<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0	0
	Not identified	0	0	0	0	0
Orange	<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0	0
	Not identified	2	0	2	2	2
Grape	<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i>	1	0	1	1	1
	Not identified	0	0	0	0	0
Total	<i>Enterococcus</i>	2	1	2	2	2
	<i>Lactobacillus</i>	1	0	1	1	1
	Not identified	3	0	3	3	3
Cluster 3						
Fuit source	Identified genus	Total number of isolates	Isolates with acidification capacity	Isolates with exopolysaccharides production	Isolates with diacetyl production	Isolates with proteolytic activity
Apple	<i>Enterococcus</i>	4	2	2	4	4
	<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0	0
	Not identified	3	0	2	3	3
Banana	<i>Enterococcus</i>	0	0	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i>	1	1	1	1	1
	Not identified	3	0	1	3	3
Orange	<i>Enterococcus</i>	1	0	0	1	1
	<i>Lactobacillus</i>	2	1	1	2	2
	Not identified	1	0	1	1	1
Grape	<i>Enterococcus</i>	8	7	7	8	8
	<i>Lactobacillus</i>	1	1	1	1	1
	Not identified	1	0	0	1	1
Total	<i>Enterococcus</i>	13	9	10	13	13
	<i>Lactobacillus</i>	4	3	3	4	4
	Not identified	8	0	4	8	8

Table S3. Antibiotic susceptibility profile of 9 lactic acid bacteria isolates selected as having the most promising probiotic-related characteristics based on PCA.

Cluster/Isolate		Ampicillin (10 µg/disc)	Chloramphenicol (30 µg/disc)	Erythromycin (15 µg/disc)	Clindamycin (2 µg/disc)	Tetracycline (30 µg/disc)	Vancomycin (30 µg/disc)	Gentamycin (10 µg/disc)	Tobramycin (10 µg/disc)	Streptomycin (300 µg/disc)
Cluster 1	Isolate 10	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Isolate 24	R	R	R	R	S	S	S	S	R
	Isolate 32	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cluster 2	Isolate 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Isolate 25	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Isolate 54	S	R	S	S	R	S	S	S	S
Cluster 3	Isolate 6	R	R	R	R	S	S	S	S	R
	Isolate 34	R	R	R	R	S	S	S	S	R
	Isolate 62	S	S	S	R	R	S	S	S	S

S: Susceptible; R: Resistant.

Table S4. Antagonistic activity of 4 lactic acid bacteria isolates selected as having the most promising probiotic-related characteristics against *E. coli* and *L. monocytogenes* based on PCA. Results are expressed as growth inhibition zones (mm, average $\pm$ standard deviation).

Isolate	Diameter of growth inhibition zones (mm)	
	<i>L. monocytogenes</i> INCQS 00266	<i>E. coli</i> INCQS 00219
2	8.5 $\pm$ 0.7	8.0 $\pm$ 1.4
10	6.0 $\pm$ 2.8	4.5 $\pm$ 0.7
25	5.5 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 0.7
32	6.5 $\pm$ 0.7	8.0 $\pm$ 1.4

APÊNDICE B – ARTIGO 2:

Combined assessment of viable counts and physiological states of fruit-derived probiotic *Limosilactobacillus fermentum* to investigate the suitability of apple and orange juice as delivery vehicles

Abstract

This study aimed to combine the measurement of viable counts and physiological states of probiotic fruit-derived *Limosilactobacillus fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in apple and orange juice during 28 days of refrigerated storage and when submitted to simulated gastrointestinal conditions, as an approach to evaluate their potential suitability as delivery vehicles for application of these probiotic isolates. Viable counts were measured with plate count and physiological states were measured with multiparametric flow cytometry using propidium iodide (PI), carboxyfluorescein diacetate (cFDA) and bis-1,3-dibutylbarbutiric acid (BOX). *L. fermentum* strains had viable counts of $>6 \log \text{ CFU/mL}$ and sizes of $>30\%$ of cell subpopulations with non-permeabilized membrane and enzymatic activities (viable cells, PI-cFDA+) in apple and orange juice during storage. Sizes of cell subpopulations with permeabilized membrane without enzymatic activity (dead cells, PI+cFDA-) were low ($<15\%$) in apple and orange juices during storage. Sizes of cell subpopulations with non-permeabilized and depolarized membrane (PI-BOX+) were decreased (14%) on day 28 of storage. Behavior of permeabilized and depolarized membrane cell subpopulation (PI+BOX-) was variable for *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in juices during storage. Both strains had high viable counts ($\geq 4.8 \log \text{ CFU/mL}$) and high PI-cFDA+ cell subpopulation sizes ($>35\%$) after exposure to ileum condition. PI-BOX+ cell subpopulation sizes were low ($<13\%$) after exposure to ileum condition. Apple and orange juice should be suitable matrices for delivery of *L. fermentum*

139 and *L. fermentum* 263 with maintenance of physiological functionality during refrigerated storage and when exposed to gastrointestinal conditions.

Keywords: *Limosilactobacillus*; physiological state; fruit juice; flow cytometry; survival.

1. Introduction

Probiotics are live microorganisms capable of conferring health benefits to host when ingested in adequate amounts (FAO/WHO, 2006), being these effects linked to viable and/or functional cells remaining during passage throughout the human gut (Shori, 2016). A wide variety of genera and microbial species have been considered as potential probiotics. However, *Lactobacillus* species (and emended genus, EFSA, 2020; Zheng et al., 2020) have been the microorganisms most commonly used as probiotics and considered the most robust for inclusion in food formulations because they are found naturally in a variety of animal and plant origin foods (de Simone, 2019).

Functional probiotic foods have conquered a growing market due to the recognition of consumers of the relationship between diet and health. However, these foods must be suitable to keep probiotics with high survival rates during storage up to the consumption to ensure their functionality (Shori, 2016; Zhu et al., 2020.). The probiotic strains selected to be incorporated into food matrices must be also capable of surviving and retaining their physiological functionality during passage to human gastrointestinal tract where they are exposed to a variety of harsh gastric and intestinal conditions (Diguță et al., 2020). The selection of probiotic strains with distinguished survival capability when incorporated into different foods and during passage to human gut should enhance probiotic efficacy linked to increased dose effects on host (Rodrigues et al., 2019).

Characteristics of viable cells include the presence and functioning of a variety of metabolic and physiological functions (Davis, 2014). Viability has been typically linked to the ability to reproduce and, subsequently, by cultivability with the enumeration of colonies formed on solid media (growth-based method). However, not all bacterial cells follow this relationship and lack the ability to

reproduce and grow under certain conditions, although they may still have many metabolic and physiological characteristics active linked to functioning viable cells. In this context, a truly “dead” cell should lack the ability to perform basic cell metabolic and physiological activities (Arbi et al., 2011; Davis, 2014; Robben et al., 2018). Multiparametric flow cytometry (MFC) has been considered a fast and reliable culture-independent technique to enumerate cells with different physiological states (de Sousa Guedes and Souza, 2018; Wilkinson et al., 2018). MFC could give a precise overview of physiological states of examined probiotic strains when incorporated in different food matrices, supporting the classic plate count or even replacing traditional microbiological approaches, besides to provide information on functional strain-related responses to different food applications (Pane et al., 2018). However, investigations using MFC to evaluate changes in physiological states of probiotics when incorporated into food matrices during storage or when submitted to conditions mimicking the human gastrointestinal tract are still scarce.

The consumption of probiotics through dairy products has been the most popular delivery approach used by food industry. However, there has been a growing interest to select probiotic strains capable of surviving in different food matrices, especially in plant-based foods or foods with low pH, because the increasing demand for non-dairy probiotic products worldwide (Garcia et al., 2018; Jackson et al., 2019). Some probiotic strains should be naturally more resistant than other counterparts to likely because of their ability to adapt to various stressing conditions, resulting in higher survival rates (Gaucher et al., 2019). An early study isolated two *Limosilactobacillus fermentum* strains (previously referred to *Lactobacillus fermentum*; EFSA, 2020; Zheng et al., 2020) from fruit processing by-products with performance in *in vitro* safety and physiological functionality tests compatible for use as probiotics (Garcia et al., 2016). Results of *in vivo* investigations have shown consistently that these *L. fermentum* strains have performance to be translated into nutritional approaches to prevent or treat cardiometabolic diseases (Cavalcante et al., 2019; Cavalcanti Neto et al., 2018; de Oliveira et al., 2020).

This study aimed to combine measurements of viable counts and physiological states of these two *L. fermentum* strains with claimed probiotic properties in apple and orange juices during refrigerated storage and when submitted to conditions mimicking the human gastrointestinal tract, as an approach to support an accurate evaluation of their potential suitability as delivery vehicles to application of these probiotic isolates.

2. Material and methods

2.1 Bacterial isolates and fruit juices

Two strains of *L. fermentum*, namely *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263, previously isolated from fruit pulp processing by-products and consistently characterized as having aptitudes to be claimed as probiotics (Cavalcante et al., 2019; Cavalcanti Neto et al., 2018; de Oliveira et al., 2020; Garcia et al., 2016) were used as test microorganisms. Stocks were maintained at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) with glycerol (Sigma Aldrich, St Louis, USA; 200 g/L). The inoculum of each strain for use in experiments was prepared with an anaerobic cultivation (Anaerogen, Oxoid, São Paulo, Brazil) in MRS broth at $37 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 18 h to achieve the stationary growth phase. Cells in cultivation medium were collected with centrifugation ($4500 \times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), washed two times and resuspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS; 8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na_2HPO_4 , 0.24 g/L KH_2PO_4 , pH 7.4) to obtain a cell suspension with optical density at 625 nm of 1.0, which had viable counts in the range of 8 to 9 log colony forming units per milliliter (CFU/mL) when plated on MRS agar (HiMedia) (de Albuquerque et al., 2017; Garcia et al., 2016).

Commercial whole apple and orange juices (Natural One™, Jarinú, São Paulo, Brazil) without additives or preservatives were purchased from local supermarkets (João Pessoa, Paraíba, Brazil). The juices were sterilized with an autoclave ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1.1 atm, 15 min) and further tested with standard procedures (APHA, 2015) for enumeration of lactic acid bacteria, mesophilic bacteria

and fungi found counts of <1 log CFU/mL for lactic acid bacteria and <2 log CFU/mL for mesophilic bacteria and fungi.

For use in experiments, a 500 mL-aliquot of apple and orange juice was aseptically inoculated with a 5 mL-aliquot of the inoculum suspension of examined *L. fermentum* strain (final viable counts in the range of 7 to 8 log CFU/mL) and stored at 4 ± 0.5 °C during 28 days. Each *L. fermentum* strain and fruit juice was tested separately in experiments.

2.2 Determination of physicochemical parameters of apple and orange juice with L. fermentum during storage

The pH, titratable acidity (TA) and total soluble solids (TSS) of apple and orange juice inoculated with examined *L. fermentum* strain were measured on day 1, 7, 14, 21 and 28 of refrigerated storage. pH was measured with a potentiometer with a combined glass electrode (Model Q400AS, Quimis, Diadema, São Paulo, Brazil). TA (expressed as g/100 g of malic and citric acid for apple and orange juice, respectively) was measured by titration with 0.1 N NaOH. TSS (°Brix) was measured with a digital refractometer (Model HI 96801, Hanna Instruments, Barueri, São Paulo, Brazil) at 25 ± 0.5 °C (AOAC, 2016).

2.3 Enumeration of viable counts of L. fermentum in apple and orange juice during refrigerated storage

On day 1, 7, 21 and 28 of refrigerated storage, a 100 µL-aliquot of apple and orange juice inoculated with examined *L. fermentum* strain was plated on MRS agar and incubated anaerobically (Anaerogen) at 37 ± 0.5 °C for 48 h. At the end of the incubation period, the visible colonies were enumerated and results were expressed as log CFU/mL.

2.4 Enumeration of viable counts of *L. fermentum* in apple and orange juice during simulated gastrointestinal conditions

A 25 mL-aliquot of apple and orange juice, as well as of MRS broth inoculated with examined *L. fermentum* strain (initial viable counts in the range of 7 to 8 log CFU/mL) was exposed to *in vitro* conditions mimicking each step of a gastrointestinal digestion (de Albuquerque et al., 2017; Garcia et al., 2018). Simulation of mouth condition was done with mechanical agitation (200 rpm, 37 ± 0.5 °C) and addition of a solution with 100 U α -amylase diluted in 1 mL of 1 mM CaCl_2 with pH adjusted to 6.9 with 1 M NaHCO_3 , with an exposure time of 2 min. Simulation of esophagus-stomach condition was done with mechanical agitation (130 rpm, 37 ± 0.5 °C) and addition of a solution with 25 mg of pepsin diluted in 1 mL of 0.1 mol/L HCl (rate of 0.05 mL/mL) and 1 mol/L HCl to decrease gradually the pH (pH 5.5, 4.6 and 3.8: exposure time of 10 min for each pH value; pH 2.8, 2.3 and 2: exposure time of 20 min for each pH value). Simulation of duodenum condition was done with mechanical agitation (45 rpm, 37 ± 0.5 °C) and addition of a solution with 2 g pancreatin/L in 0.1 mol/L NaHCO_3 and 12 g/L of bovine bile in 0.1 mol/L NaHCO_3 , with pH adjusted to 5 with 0.1 M NaHCO_3 , and an exposure time of 30 min. Simulation of ileum condition was done with mechanical agitation (25 rpm, 37 ± 0.5 °C) and adjusting the pH to 6.5 with 0.1 M NaHCO_3 , with an exposure time of 60 min. Enzymes and reagents used in simulated digestion were purchased from Sigma Aldrich. Apple and orange juice were exposed to the different simulated gastrointestinal digestion steps continuously. Samples of apple and orange juice and MRS broth inoculated with examined *L. fermentum* maintained at 37 ± 0.5 °C without exposure to the simulated gastrointestinal digestion were used as internal controls.

After the exposure to each step of the simulated gastrointestinal digestion, a 100 μL -aliquot of apple and orange juice and MRS broth was serially diluted in sterile saline solution (NaCl 8.5 g/L) and plated on MRS agar. After an anaerobic incubation (Anaerogen) of 48 h at 37 ± 0.5 °C, the visible colonies were enumerated and results were expressed as CFU/mL.

2.5 Measurements of physiological functions of *L. fermentum* in apple and orange juices during refrigerated storage and when exposed to simulated gastrointestinal conditions with MPF

2.5.1 Staining procedure

On day 1, 7, 14, 21 and 28 of refrigerated storage and/or after exposure to each step of the simulated gastrointestinal digestion, samples of apple and orange juice and/or MRS both inoculated with examined *L. fermentum* strains were washed two times with PBS by centrifugation ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C) and incubated for 15 min in the dark for double-staining with propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, 10 µg/mL) and carboxyfluorescein diacetate (cFDA, Sigma-Aldrich, 2.5 µg/mL) to evaluate cytoplasmic membrane integrity and enzymatic activity in cells, respectively. Additionally, a double-staining with PI (10 µg/mL) and bis-1,3-dibutylbarbutiric acid (BOX, Invitrogen, Eugene, OR, USA, 0.5 µg/mL) for 15 min in the dark was used to evaluate cytoplasmic membrane integrity and membrane potential of cells, respectively. After the staining procedures, the cell suspensions were washed with an equal volume of PBS by centrifugation ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C) to remove excess dye (Bunthof and Abee, 2002; de Sousa Guedes and de Souza, 2018; Maukonen et al., 2006).

2.5.2 MFC analysis and data acquisition

Analyses were done in a flow cytometer with an argonion laser emitting at 488 nm (BD Accuri C6, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Channels FL1 (533 nm $\pm$ 30 nm, cFDA and BOX) and FL3 (>670 nm, PI) collected the green and red fluorescence, respectively. Threshold levels for data acquisition were set on forward scatter (FSC) (12,000) and side scatter (SSC) (30,000) to eliminate particles much smaller than intact cells and delimit the bacterial cells, respectively. Each sample acquisition was done with a low flow rate setting and a total of 10,000 events were analyzed. An automatic compensation was used. Data analysis was done with BD Accuri C6 Software (Becton Dickinson and Company).

Density plots indicating FSC versus SSC was designed to identify the bacterial population of interest. Another specific region in FL1 versus FL3 density plots were gated to display the staining results. Four quadrants (gates) were defined to comprise each cell subpopulation according to the fluorescence in the readings based on the dye used. For the dual-staining with PI and cFDA, the subpopulations characterized as PI-cFDA⁺ (gate upper left; UL) were considered non-permeabilized cells with enzymatic activity; and PI+cFDA⁻ (gate lower right; LR) were considered permeabilized cells without enzymatic activity. For the dual staining with PI and BOX, subpopulations characterized as PI-BOX⁺ (gate upper left; UL) were considered non-permeabilized and depolarized membrane cells; and PI+BOX⁻ (gate lower right; LR) subpopulations were considered permeabilized and polarized membrane cells (Araújo et al., 2020; de Souza Pedrosa et al., 2020). PI is a hydrophilic cationic molecule and membrane impermeant capable of staining nucleic acids, being widely used as a membrane integrity indicator in bacterial cells. cFDA is an aromatic carboxylic acid capable of entering living cells and enzymatically hydrolyzed by acetylsterases to emit polar fluorescent that accumulates into bacterial cytoplasm, being used to indicate enzymatic/metabolic activity in cells. BOX is a lipophilic dye (with anionic charge) not capable of passing through polarized membranes of living cells, being used to indicate membrane potential/polarization (Gandhi and Shah, 2015; Sträuber and Müller, 2010).

2.6 Statistical analysis

The experiments were done in triplicate in three independent repetitions. Data were expressed as average $\pm$ standard deviation. ANOVA followed by Tukey's test was used to determine significant differences among results. A redundancy analysis (RDA) was done to analyze the relationship between fruit juice physicochemical parameters with bacterial cytometric parameters. A Pearson's correlation test was done to evaluate the relationship between bacterial viable counts with bacterial cytometric parameters. A p-value of <0.05 was considered as statistically significant. Statistical

analyses were done with R software (Version 2.15.3, Ross Ihaka & Robert Gentleman, University of Auckland, Auckland, New Zealand).

3. Results and discussion

3.1 Physicochemical parameters of apple and orange juice with *L. fermentum* during refrigerated storage

The pH, TA and TSS values in apple and orange juice with *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 during 28 days of refrigerated storage are shown in Table 1. pH of apple juice with *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 was similar ($p \geq 0.05$) on day 1 and 28 of storage. Orange juice with *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 had an increase ($p < 0.05$) in pH values during storage. TA values did not change ($p \geq 0.05$) in apple juice with examined *L. fermentum* strains during storage; however, TA values decreased ($p < 0.05$) in orange juice during storage. TSS values did not change ($p \geq 0.05$) in apple and orange juice with examined *L. fermentum* strains during storage.

Low pH and/or high organic acid content in fruit juices can inhibit bacterial growth and lead to cell death (Speranza et al., 2020). Antibacterial effects of organic acids are increased at low pH values, which induce these acids to be transformed into their undissociable forms. In undissociable forms, organic acids can easily penetrate into bacterial cytoplasmic membrane and change the cytosolic pH. The main organic acids found in apple and orange juice are citric and malic acid, respectively (Kim and Rhee, 2013). The better pH values to citric and malic acids be transformed in their indissociable forms are close to 3.1 and 3.4, respectively (Ephrem et al., 2019), which were not found in apple and orange juice with *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 during the measured storage period.

Some probiotic lactobacilli can metabolize citric acid as energy source to adapt to acidic environments and produce aromatic compounds (e.g., ketones, alcohols, aldehydes and esters) increasing the medium pH (Miranda et al., 2019), which could have occurred in orange juice with

examined *L. fermentum* strains during storage. Although most lactobacilli can decarboxylate malic acid into lactic acid by a single malolactic enzyme (Lu et al., 2018), it seemed to not occur in apple juice with examined *L. fermentum* strains, as its TA and pH were not altered during storage.

3.2 Viable counts of *L. fermentum* in apple and orange juice during refrigerated storage

The viable counts of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in apple and orange juice during 28 days of refrigerated storage are shown in Table 2. Viable counts of *L. fermentum* 139 in apple juice were of >7 log CFU/mL up to day 21 of storage ($p \geq 0.05$) and only a decrease of <1 log was found on day 28 of storage ($p < 0.05$) with viable counts remaining >6 log CFU/mL. The viable counts of *L. fermentum* 139 in orange juice had a <1 log decrease on day 7 of storage ($p < 0.05$), but an increase was found on day 21 of storage ($p < 0.05$) with viable counts remaining as high as >6 log CFU/mL up to day 28 of storage. The viable counts of *L. fermentum* 263 in apple and orange juice were of >7 log CFU/mL during the 28 days of storage.

Early investigations have shown that *Lactobacillus* strains with distinguished survival in fruit juices should have high tolerance to acidic environments, such as those found in apple and orange juice, enabling them to keep high viable counts in these substrates over time (Peng et al., 2021). Detection of viable counts as high as >6 log CFU per mL or g of a probiotic strain in selected delivery vehicle up to the moment of consumption has been considered a key quality indicator from a practical point of view (Žuntar et al., 2020), indicating that apple and orange juice could be appropriate delivery matrices for the examined *L. fermentum* strains.

3.3 Physiological characteristics of *L. fermentum* in apple and orange juice during refrigerated storage

The sizes of cell subpopulations of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 with dual-staining with PI and cFDA, as well as with PI and BOX in apple and orange juice during 28 days of

refrigerated storage are shown in Table 2. The used protocol for MFC analysis enabled to categorize the bacterial population in four distinct subpopulations: i) viable cells with enzymatic (or metabolic) activity and non-permeabilized membrane (PI-cFDA+); ii) dead cells with permeabilized membrane (PI+cFDA-) without enzymatic activity; iii) injured cells with non-permeabilized and depolarized membrane (PI-BOX+); and iv) injured cells with permeabilized and polarized membrane (PI+BOX-) (Gandhi et al., 2015; Paparella et al., 2008).

PI-cFDA+ cell subpopulation of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 had sizes of >30% and >35% in apple and orange juice, respectively, during the 28 days of refrigerated storage, whereas the low sizes of PI+cFDA- cell subpopulation were in the range of 2.1 ± 0.2 to $15.2 \pm 0.3\%$. There was a decrease of PI-cFDA+ cell subpopulation sizes for *L. fermentum* 139 and an increase for *L. fermentum* 263 in apple and orange juice on day 28 of storage ($p < 0.05$).

The sizes of PI-BOX+ and PI+BOX- cell subpopulations of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in apple and orange juice on day 1 of storage were in the range of 18.6 ± 0.3 to $27.9 \pm 0.2\%$ and 11.3 ± 0.5 to $44.1 \pm 1.8\%$, respectively; whereas they were in the range of 11.5 ± 0.2 to $13.5 \pm 0.2\%$ and 12.3 ± 0.5 to $49.8 \pm 0.3\%$, respectively, on day 28 of storage. The sizes of cell subpopulations with non-permeabilized and depolarized membrane were overall decreased on day 28 of storage to both strains. Furthermore, the sizes of PI+BOX- cell subpopulations of *L. fermentum* 139 decreased ($p < 0.05$) during storage whereas this subpopulation increased during storage for *L. fermentum* 263.

These results indicate that a high percentage of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells remained viable and metabolically active (PI-cFDA+) in apple and orange juice during the 28 days of refrigerated storage, although the percentage of dead cells (PI+cFDA-) had increased over time but remained below 15%. In parallel, the percentage of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells with non-permeabilized and depolarized membrane (PI-BOX+) decreased during storage remaining below 14%. Alterations in percentage of injured cells with permeabilized membrane

(PI+BOX-) differed for *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in apple and orange juice during storage.

The high percentage of viable and metabolically active cells of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in apple and orange juice during storage could be linked to the reported capability of some *Lactobacillus* strains of preventing intracellular accumulation of organic acids possibly due to membrane composition modulation to keep functional membrane permeability when exposed to acidic conditions and/or low temperatures. However, *Lactobacillus* cells under osmotic or acid stress (as such commonly found in fruit juices) could also lose a layer from cell wall by plasmolysis causing disturbance of membrane integrity and depolarization, as a consequence of cell enlargement due to compatible solute accumulation (Broadbent et al., 2010; Gaucher et al., 2019). These disturbing effects could be associated with the percentage of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells with permeabilized and depolarized membrane found in apple and orange juice during storage.

Probably, *L. fermentum* 139 cells with permeabilized membrane became metabolically inactive dead cells in apple and orange juice during storage or in an attempt to recover their viability in these substrates another type of damage occurred in these cells, as the percentage of non-permeabilized and enzymatically active cells did not increase over time despite of the decrease in percentage of permeabilized cells. Still, *L. fermentum* 263 cells with depolarized membrane could have remained metabolically active (viable) or evolved to permeabilization and death in apple and orange juice during storage, as the percentage of both enzymatically active and permeabilized cells were increased at the end of the measured storage period.

The RDA showed a relationship of fruit juice pH closer to PI-cFDA+ than to PI+cFDA-, and a relationship of TA and TSS closer to PI-BOX+ than to PI+BOX- ($p < 0.001$) (Fig. 1). These results indicate that as the pH of fruit juice increased the sizes of cell subpopulation with non-permeabilized membrane and metabolic activity increased. It also indicated that as the TA and TSS of fruit juice

increased the sizes of cell subpopulation with non-permeabilized and depolarized membrane increased. In addition, there was a very strong correlation ($R = 0.90$; $p < 0.001$) between viable counts and sizes of cell subpopulation with intact membrane and enzymatic activity (PI-cFDA+) in fruit juices (data not shown). This correlation indicates that PI-cFDA+ subpopulation detected by FCM should be account for the viable counts of examined *L. fermentum* strains found in apple and orange juice during storage.

3.4 Viable counts of *L. fermentum* in MRS broth and apple and orange juice during simulated gastrointestinal conditions

The viable counts of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 at different steps of the simulated gastrointestinal digestion in MRS broth and apple and orange juice are shown in Table 3. Viable counts of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in MRS broth during exposure to the different steps of the simulated steps of gastrointestinal digestion remained high (7.1 ± 0.8 to 7.9 ± 0.2 CFU/mL). Viable counts of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 had greater reductions in apple and orange juices than in MRS broth during the simulated gastrointestinal digestion. However, both strains still had high survival rates in apple and orange juices during the simulated gastrointestinal digestion, with viable counts in the range of 4.8 ± 0.3 to 5.1 ± 0.2 log CFU/mL.

The capability of probiotics of keeping high viable counts in each step of the gastrointestinal digestion has been species and strain-dependent (Gaucher et al., 2019). Major stresses affecting probiotic survival during gastrointestinal digestion are the very low pH in stomach, presence of bile salts in intestine, variations in redox potential and presence of different lytic enzymes (e.g., pepsin and pancreatin) (Gaucher et al., 2019). As the target of probiotics is the gut, the ability of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 to maintain high viable counts in apple and orange juice up to the end of the simulated gastrointestinal digestion (ileum condition) is an important result, as the

viability and proper release of probiotics through gastrointestinal tract passage are important to reach their beneficial effects on host (Sampaio et al., 2021).

3.5 Physiological characteristics of *L. fermentum* in MRS broth and apple and orange juice during simulated gastrointestinal conditions

The sizes of cell subpopulations of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 with dual-staining with PI and cFDA as well as with PI and BOX in apple and orange juice at different steps of the simulated gastrointestinal digestion are shown in Table 3. The sizes of PI-cFDA⁺ cell subpopulations of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in MRS broth and apple and orange juice decreased ($p < 0.05$) up to exposure to stomach condition, being followed by an increase ($p < 0.05$) or maintenance of similar sizes ($p \geq 0.05$) after exposure to duodenum and ileum condition. PI-cFDA⁺ subpopulations had sizes in the range of 36.1 ± 0.8 to $58.8 \pm 1.6\%$ after exposure to ileum condition. Otherwise, the sizes of PI+cFDA⁻ cell subpopulations of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 increased ($p < 0.05$) up to exposure to stomach or duodenum condition in MRS broth and apple and orange juice. The sizes of PI+cFDA⁻ cell subpopulations increased ($p < 0.05$) up to exposure to stomach condition in apple and orange juice, but did not change ($p \geq 0.05$) when further exposed to ileum condition. PI+cFDA⁻ cell subpopulations of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 had low sizes (14.1 ± 0.7 to $19.7 \pm 0.3\%$) after exposure to ileum condition. PI-cFDA⁺ cell subpopulations cell were higher than PI+cFDA⁻ cell subpopulations during exposure to different steps of the simulated gastrointestinal digestion.

The sizes of PI-BOX⁺ cell subpopulations of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in MRS broth and apple and orange juice were in the range of 18.3 ± 0.7 to $38.2 \pm 0.5\%$ when exposed to mouth condition. The sizes of these cell subpopulations decreased overall ($p < 0.05$) during exposure to further steps of the simulated gastrointestinal digestion, being found low cell subpopulation sizes (8.9 ± 0.2 to $12.5 \pm 0.6\%$) after exposure to ileum condition. The sizes of PI+BOX⁻ cell subpopulations

of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in MRS broth and apple and orange juice increased overall ($p < 0.05$) during the simulated gastrointestinal digestion, being found cell subpopulation sizes in the range of 50.5 ± 0.6 to $69.9 \pm 1.0\%$ after exposure to ileum condition. The only exception was *L. fermentum* 139 in apple juice with similar sizes ($p \geq 0.05$) of PI+BOX- cell subpopulations during exposure to the different steps of the simulated gastrointestinal digestion.

In most of cases, the percent of non-permeabilized and enzymatically active (viable) cells of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 in apple and orange juice were of $>35\%$ during exposure to different steps of the simulated gastrointestinal digestion. The high percentage of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells in a viable state could be linked to their capability of maintaining cell permeability under specific stressing conditions (Gaucher et al., 2019; Tripathi and Giri, 2014.). In media with high osmolarity, which can occur due to the presence of proteases and lytic compounds from action of pancreatin toward food components, cells of some *Lactobacillus* species could enhance their surface hydrophobicity to improve membrane permeability function and better tolerate this type of stress. Lipoteichoic acids and proteins are the most important cell wall components account for surface hydrophobicity in *Lactobacillus* (Machado et al., 2004). Furthermore, overproduction of ATPase to improve energy production has been reported as an important mechanism to enhance the survival of *Lactobacillus* under acidic and bile salt stress by protecting cells from membrane permeabilization, which can be an irreversible cell damage (Goh and Klaenhammer, 2014). This should explain the results showing low sizes of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells with permeabilized membrane and without enzymatic activity (dead cells) during exposure to simulated gastrointestinal digestion in apple and orange juice.

Increased surface hydrophobicity in *Lactobacillus* can also prevent the accumulation of ions within the membrane in acidic environments, which should cause membrane depolarization (Ruiz et al., 2013). Depolarized membrane seems to be a reversible stage prior to membrane integrity damage and, consequently, cell death (de Sousa Guedes and de Souza, 2018). This could

be associated with the results showing a decrease of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells with depolarized membrane during the simulated gastrointestinal digestion in apple and orange juice, being found low sizes of this subpopulation after exposure to ileum condition.

Early studies have reported the capability of some *Lactobacillus* strains of changing the proportion of phospholipids and glycolipids in membrane to keep the membrane stability and bilayer structure when challenged with stressing conditions. Particularly, the hydrophilic portion of glycolipids can form pores in membrane to enhance permeabilization for ions and solutes, as a result of modification in lipid–protein and lipid–lipid interactions affecting membrane transport activities (Gaucher et al., 2019; Goh and Klaenhammer, 2014). It seems to be a reversible process in *Lactobacillus* cells, although inducing an apparent damage to cell membrane, which could be possibly associated with the results showing overall high sizes of subpopulations of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells with permeabilized and polarized membranes up to the end of the simulated gastrointestinal digestion.

There was a moderate correlation ($R = 0.7$; $p < 0.05$) between the viable counts and sizes of cell subpopulation with intact membrane and enzymatic activity (PI-cFDA+) during the simulated gastrointestinal digestion. Interestingly, even with a >3 log decrease in viable counts, a high percentage of non-permeabilized and enzymatically active cells of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 was found during exposure to the different steps comprising the simulated gastrointestinal digestion in apple and orange juice. This should indicate that part of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells could be entered into a viable but not culturable state (VBNC) as a consequence of the exposure to the digestive stressing conditions that could affect different physiological functions and cause sublethal injury to cells (Robben et al., 2018).

The VBNC cells are still metabolically active but do not grow on culture media and are undetectable by traditional culture methods (Paparella et al., 2008; Rodrigues et al., 2019), although they should be detected combining enumeration of viable counts with plate count and measurements

of physiological functions with MFC technique (Barbosa et al., 2020; Pane et al., 2018). However, VBNC cells of probiotic lactobacilli could recover from sublethal injuries and reestablish broad functioning and replicate when encountering more hospitable environments, such as when deployed in the gut once *Lactobacillus* species, as constituent gut microbes, reach the anatomical niche in the host to which they should be well-adapted (Davis, 2014). The existence of VBNC subpopulations among *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells when exposed to conditions mimicking the gastrointestinal digestion or other environmental stresses found during industrial processing should be a focus of a more detailed investigation.

4. Conclusion

Results showed that *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 strains with claimed probiotic properties have high viable counts in apple and orange juice during 28 days of refrigerated storage, as well as when subjected to a simulated gastrointestinal digestion in these juices. In parallel, high percentage of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells maintained physiological functions, specifically non-permeabilized and polarized membrane and enzymatic/metabolic activity, in apple and orange juice during refrigerated storage and when submitted to a simulated gastrointestinal digestion. Difference in dynamics found for viable counts and measured physiological states following the exposure to the simulated gastrointestinal digestion indicated that part of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells could be sublethally injured rather than dead. Finally, apple and orange juice could be potential suitable vehicles for delivery of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells with maintenance of high number of cells physiologically active (keeping vitality) during refrigerated storage and when further exposed to harsh gastric and intestinal conditions during passage throughout the human gut.

Acknowledgments

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for partial funding of this research (Finance code 001) as well as for the PhD scholarship awarded to the authors K.B. de Medeiros.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contribution

Conceptualization: NPAR, EFG, JPSG, ELS. Data curation: NPAR, ELS; Formal analysis: NPAR, ELS; Funding acquisition: NPAR, ELS; Investigation: NPAR, EFG, KBS, HMAN, JPSG, ELS; Methodology: NPAR, JPSG, ELS; Project administration: ELS; Resources: NPAR, ELS; Supervision: ELS; Validation: NPAR, EFG, JPSG, ELS.; Visualization; Writing – original draft: NPAR, JPSG, ELS; Writing – review & editing: NPAR, ELS.

References

- AOAC. 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th edn. Salt Lake City.
- APHA. 2015. Compendium for the Microbiological Examination of Foods. Washington DC.
- Araújo, C.M., Sampaio, K.B., Menezes, F.N.D.D., Almeida, E.T. da C., Lima, M.D.S., Viera, V.B., Garcia, E.F., Gómez-Zavaglia, A., de Souza, E.L., de Oliveira, M.E.G. 2020. Protective effects of tropical fruit processing coproducts on probiotic *Lactobacillus* strains during freeze-drying and storage. *Microorganisms* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010096>
- Barbosa, I.M., Almeida, E.T.C., Gomes, A.C.A., de Souza, E.L. 2020. Evidence on the induction of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in a meat-based broth. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 62, 102351. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102351>
- Broadbent, J.R., Larsen, R.L., Deibel, V., Steele, J.L. 2010. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *J. Bacteriol.* 192, 2445–2458. <https://doi.org/10.1128/JB.01618-09>

- Bunthof, C.J., Abee, T. 2002. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2934–2942. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2934-2942.2002>
- Cavalcante, R.G.S., de Albuquerque, T.M.R., de Luna Freire, M.O., Ferreira, G.A.H., Carneiro dos Santos, L.A., Magnani, M., Cruz, J.C., Braga, V.A., de Souza, E.L., de Brito Alves, J.L. 2019. The probiotic *Lactobacillus fermentum* 296 attenuates cardiometabolic disorders in high fat diet-treated rats. *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis.* 29, 1408-1417, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2019.08.003>
- Cavalcanti Neto, M.P., Aquino, J. de S., Romão da Silva, L. de F., de Oliveira Silva, R., Guimarães, K.S. de L., de Oliveira, Y., de Souza, E.L., Magnani, M., Vidal, H., de Brito Alves, J.L. (2018). Gut microbiota and probiotics intervention: A potential therapeutic target for management of cardiometabolic disorders and chronic kidney disease? *Pharmacol. Res.* 130, 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.020>
- Davis, C. 2014. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J. Microbiol. Methods* 103, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.04.012>
- de Albuquerque, T.M.R., Garcia, E.F., de Oliveira Araújo, A., Magnani, M., Saarela, M., de Souza, E.L. 2018. *In vitro* characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Prob. Antimicrob. Prot.* 10, 704–716. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
- de Oliveira, Y., Cavalcante, R.G.S., Cavalcanti Neto, M.P., Magnani, M., Braga, V.D.A., de Souza, E.L., de Brito Alves, J.L. 2020. Oral administration of *Lactobacillus fermentum* post-weaning improves the lipid profile and autonomic dysfunction in rat offspring exposed to maternal dyslipidemia. *Food Funct.* 11, 5581–5594. <https://doi.org/10.1039/d0fo00514b>
- de Simone, C. 2019. The unregulated probiotic market. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 17, 809–817. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.01.018>
- de Sousa Guedes, J.P., de Souza, E.L. 2018. Investigation of damage to *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis exposed to *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in pineapple and mango juice by flow cytometry. *Food Microbiol.* 76, 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.020>
- de Souza Pedrosa, G.T., de Souza, E.L., de Melo, A.N.F., da Cruz Almeida, E.T., de Sousa Guedes, J.P., de Carvalho, R.J., Pagán, R., Magnani, M. 2020. Physiological alterations involved in inactivation of autochthonous spoilage bacteria in orange juice caused by *Citrus* essential oils and mild heat. *Int. J. Food Microbiol.* 334, 108837. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108837>
- Diguță, C.F., Nițoi, G.D., Matei, F., Luță, G., Cornea, C.P. 2020. The biotechnological potential of *Pediococcus* spp. isolated from Kombucha microbial consortium. *Foods* 9, 1780. <https://doi.org/10.3390/foods9121780>

El Arbil, A., Ghorbal, S., Delacrois-Buchet, A., Bouix, M. 2010. Assessment of the dynamics of the physiological states of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 during growth by flow cytometry. J. Appl. Microbiol. 111, 1205–1211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05114.x>

European Food Safety Authority (EFSA). 2020. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. EFSA J. 18, e06174. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6174>

Ephrem, E., Najjar, A., Charcosset, C., Greige-Gerges, H. 2019. Use of free and encapsulated nerolidol to inhibit the survival of *Lactobacillus fermentum* in fresh orange juice. Food Chem. Toxicol. 133, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110795>

Food and Agriculture Organization of the United Nation. 2006. Probiotics in food. World Health Organization. Third Edition. <https://doi.org/10.1201/9781420009613.ch16>

Gandhi, A., Shah, N.P. 2015. Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry. Food Microbiol. 49, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.003>

Garcia, E.F., de Oliveira Araújo, A., Luciano, W.A., de Albuquerque, T.M.R., de Oliveira Arcanjo, N.M., Madruga, M.S., dos Santos Lima, M., Magnani, M., Saarela, M., de Souza, E.L. 2018. The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. J. Sci. Food Agric. 98, 5000–5010. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9034>

Garcia, E.F., Luciano, W.A., Xavier, D.E., da Costa, W.C.A., Oliveira, K. de S., Franco, O.L., de Moraes Júnior, M.A., Lucena, B.T.L., Picão, R.C., Magnani, M., Saarela, M., de Souza, E.L. 2016. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. Front. Microbiol. 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>

Gaucher, F., Bonnassie, S., Rabah, H., Marchand, P., Blanc, P., Jeantet, R., Jan, G. 2019. Review: Adaptation of beneficial propionibacteria, lactobacilli, and bifidobacteria improves tolerance toward technological and digestive stresses. Front. Microbiol. 10, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00841>

Goh, Y.J., Klaenhammer, T.R. 2014. Insights into glycogen metabolism in *Lactobacillus acidophilus*: Impact on carbohydrate metabolism, stress tolerance and gut retention. Microb. Cell Fact. 13, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0094-3>

Jackson, S.A., Schoeni, J.L., Vegge, C., Pane, M., Stahl, B., Bradley, M., Goldman, V.S., Burguière, P., Atwater, J.B., Sanders, M.E. 2019. Improving end-user trust in the quality of commercial probiotic products. Front. Microbiol. 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00739>

Kim, S.A., Rhee, M.S. 2013. Marked synergistic bactericidal effects and mode of action of medium-chain fatty acids in combination with organic acids against *Escherichia coli* O157: H7. Appl. Environ. Microbiol. 79, 6552–6560. <https://doi.org/10.1128/AEM.02164-13>

- Lu, Y., Tan, C.W., Chen, D., Liu, S.Q. 2018. Potential of three probiotic lactobacilli in transforming star fruit juice into functional beverages. *Food Sci. Nutr.* 6, 2141–2150. <https://doi.org/10.1002/fsn3.775>
- Machado, M.C., López, C.S., Heras, H., Rivas, E.A. 2004. Osmotic response in *Lactobacillus casei* ATCC 393: Biochemical and biophysical characteristics of membrane. *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.11.001>
- Maukonen, J., Alakomi, H.L., Nohynek, L., Hallamaa, K., Leppämäki, S., Mättö, J., Saarela, M. 2006. Suitability of the fluorescent techniques for the enumeration of probiotic bacteria in commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products. *Food Res. Int.* 39, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.05.006>
- Miranda, R.F., de Paula, M.M., da Costa, G.M., Barão, C.E., da Silva, A.C.R., Raices, R.S.L., Gomes, R.G., Pimentel, T.C. 2019. Orange juice added with *L. casei*: is there an impact of the probiotic addition methodology on the quality parameters? *LWT Food Sci. Technol.*, 106, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.047>
- Paparella, A., Taccogna, L., Aguzzi, I., Chaves-Lopez, C., Serio, A., Marsilio, F., Suzzi, G. 2008. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Cont.* 19, 1174–1182.
- Peng, W., Meng, D., Yue, T., Wang, Z., Gao, Z. 2021. Effect of the apple cultivar on cloudy apple juice fermented by a mixture of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus fermentum*. *Food Chem.* 340, 127922. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127922>
- Robben, C., Fister, S., Witte, A.K., Schoder, D., Rossmanith, P., Mester, P. 2018. Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts. *Sci. Rep.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33595-5>
- Rodrigues, V.C.C., Silva, L.G.S., Simabuco, F.M., Venema, K., Antunes, A.E.C. 2019. Survival, metabolic status and cellular morphology of probiotics in dairy products and dietary supplement after simulated digestion. *J. Funct. Food* 55, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.046>
- Ruiz, L., Margolles, A., Sánchez, B. 2013. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front. Microbiol.* 4, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00396>
- Sampaio, K.B., do Nascimento, Y.M., Tavares, J.F., Cavalcanti, M.T., de Brito Alves, J.L., Garcia, E.F., de Souza, E.L. 2021. Development and *in vitro* evaluation of novel nutraceutical formulations composed of *Limosilactobacillus fermentum*, quercetin and/or resveratrol. *Food Chem.* 342, 128264. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128264>
- Shori, A.B. 2016. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Biosci.* 13, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.11.001>
- Speranza, B., Campaniello, D., Petrucci, L., Altieri, C., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., Corbo, M.R. 2020. The inoculation of probiotics *in vivo* is a challenge: Strategies to improve their survival, to

avoid unpleasant changes, or to enhance their performances in beverages. *Beverages* 6, 1–18. <https://doi.org/10.3390/beverages6020020>

Sträuber, H., Müller, S. 2010. Viability states of bacteria-specific mechanisms of selected probes. *Cytom. Part A*, 77, 623–634. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20920>

Tripathi, M.K., Giri, S.K. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods* 9, 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

Wilkinson, M.G. 2018. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.006>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 70, 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zhu, W., Lyu, F., Naumovski, N., Ajlouni, S., Ranadheera, C.S. 2020. Functional efficacy of probiotic *Lactobacillus sanfranciscensis* in apple, orange and tomato juices with special reference to storage stability and in vitro gastrointestinal survival. *Beverages* 6, 1–9. <https://doi.org/10.3390/beverages6010013>

Žuntar, I., Petric, Z., Kovacevic, D.B., Putnik, P. 2020. Safety of probiotics: Functional fruit beverages and nutraceuticals. *Foods* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3390/foods9070947>

Figure caption

Fig. 1. Output of redundancy analysis (RDA) showing the relationship between physiological characteristics of *Limosilactobacillus fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 cells in apple and orange juices during 28 days of refrigerated storage with physicochemical parameters measured in these juices.

Table 1 - Values of physicochemical parameters of apple and orange juice inoculated with *Limosilactobacillus fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).

Juice	Isolate	Day of storage	Physicochemical parameters			
			pH	Total soluble solids (TSS, °Brix)	Titratable acidity (TA, g/100 g)	
					Citric acid	Malic acid
Apple juice	<i>L. fermentum</i> 139	1	3.77±0.20 ^A	11.35±0.11 ^B	NA	2.21±0.50 ^A
		7	3.69±0.31 ^B	12.20±0.10 ^A	NA	2.11±0.32 ^A
		14	3.53±0.10 ^C	10.70±0.12 ^B	NA	2.18±0.41 ^A
		21	3.61±0.10 ^D	10.70±0.15 ^B	NA	2.13±0.22 ^A
		28	3.83±0.41 ^A	10.80±0.40 ^B	NA	2.11±0.16 ^A
	<i>L. fermentum</i> 263	1	3.77±0.22 ^A	11.46±0.10 ^B	NA	3.21±0.08 ^A
		7	3.69±0.08 ^A	12.30±0.12 ^A	NA	2.01±0.20 ^A
		14	3.70±0.10 ^A	10.90±0.13 ^B	NA	2.01±0.16 ^A
		21	3.81±0.25 ^A	10.80±0.11 ^B	NA	2.01±0.07 ^A
		28	3.87±0.21 ^A	10.80±0.52 ^B	NA	3.05±0.21 ^A
Orange Juice	<i>L. fermentum</i> 139	1	3.71±0.22 ^A	12.10±0.24 ^A	7.32±0.20 ^A	NA
		7	3.76±0.20 ^A	11.90±0.22 ^A	7.04±0.22 ^C	NA
		14	3.54±0.15 ^A	12.00±0.20 ^A	7.18±0.16 ^B	NA
		21	4.39±0.11 ^B	11.70±0.33 ^A	5.48±0.22 ^D	NA
		28	4.41±0.20 ^B	11.55±0.44 ^A	5.41±0.20 ^D	NA
	<i>L. fermentum</i> 263	1	3.71±0.25 ^A	12.10±0.20 ^A	8.32±0.15 ^A	NA
		7	4.19±0.13 ^B	11.70±0.31 ^A	5.76±0.13 ^C	NA
		14	4.09±0.31 ^C	11.60±0.45 ^A	6.40±0.33 ^B	NA
		21	4.15±0.40 ^B	11.50±0.31 ^A	5.52±0.24 ^D	NA
		28	4.14±0.21 ^D	11.51±0.41 ^A	5.48±0.31 ^D	NA

^{A-E} Different capital letters in the same column indicate significant difference for the same strain and fruit juice at different storage time periods. NA: not applicable.

Table 2 - Viable counts (Log CFU/mL) of *Limosilactobacillus fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 and sizes (%) of their subpopulations with different physiological characteristics in apple and orange juice during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).

Juice	Isolate	Day of storage	Viable count (Log CFU/mL)	Size of cell subpopulation (%)			
				PI-cFDA+	PI+cFDA-	PI-BOX+	PI+BOX-
Apple juice	<i>L. fermentum</i> 139	1	7.3±0.2 ^A	44.4±0.3 ^B	2.4±0.5 ^D	21.1±0.5 ^B	44.1±1.8 ^C
		7	7.7±0.3 ^A	46.9±0.3 ^A	3.7±0.3 ^C	22.3±0.3 ^A	50.2±0.2 ^A
		14	7.6±0.1 ^A	27.2±0.4 ^E	12.6±0.8 ^B	18.3±0.2 ^C	48.1±0.6 ^B
		21	7.4±0.4 ^A	36.7±0.2 ^C	13.7±0.8 ^B	16.7±0.4 ^D	35.2±0.1 ^D
		28	6.7±0.1 ^B	35.4±0.5 ^D	15.2±0.3 ^A	13.5±0.2 ^E	16.9±0.8 ^E
	<i>L. fermentum</i> 263	1	8.3±0.2 ^A	41.0±0.5 ^C	4.4±0.6 ^C	18.6±0.3 ^A	16.8±0.4 ^D
		7	6.4±0.5 ^C	47.8±0.3 ^B	5.2±0.3 ^C	16.1±0.1 ^B	17.3±0.3 ^D
		14	6.8±0.7 ^D	39.2±0.1 ^D	5.4±0.2 ^C	15.9±0.3 ^B	36.3±0.3 ^C
		21	6.3±0.4 ^E	35.9±0.1 ^E	7.0±0.4 ^B	13.5±0.3 ^C	43.7±0.5 ^B
		28	7.1±0.3 ^B	68.2±0.3 ^A	11.7±0.4 ^A	11.5±0.2 ^D	49.8±0.3 ^A
Orange juice	<i>L. fermentum</i> 139	1	6.7±0.1 ^A	37.8±0.6 ^A	3.6±0.1 ^C	24.1±0.7 ^A	19.8±0.6 ^A
		7	6.0±0.6 ^C	32.4±0.5 ^D	5.5±0.4 ^B	23.8±0.4 ^A	13.3±0.5 ^D
		14	6.1±0.6 ^C	31.1±0.6 ^E	5.8±0.5 ^B	21.6±0.2 ^B	14.2±0.2 ^C
		21	6.4±0.5 ^B	37.6±0.2 ^B	5.8±0.2 ^B	13.2±0.4 ^C	15.5±0.4 ^B
		28	6.3±0.3 ^B	36.5±0.3 ^C	6.6±0.4 ^A	12.1±0.3 ^D	12.3±0.5 ^D
	<i>L. fermentum</i> 263	1	8.8±0.3 ^A	74.3±1.9 ^B	2.1±0.2 ^C	27.9±0.2 ^A	11.3±0.5 ^C
		7	8.6±0.7 ^A	74.3±2.3 ^B	3.3±0.5 ^B	25.4±0.3 ^B	11.7±0.6 ^C
		14	8.2±0.7 ^A	67.6±0.3 ^D	3.6±0.2 ^B	16.4±0.3 ^C	12.5±0.5 ^C
		21	7.7±0.2 ^A	70.9±1.5 ^C	3.8±0.3 ^B	12.6±0.4 ^D	13.5±0.2 ^B
		28	7.5±0.1 ^A	88.9±2.1 ^A	4.3±0.2 ^A	11.9±0.5 ^D	18.7±0.1 ^A

PI-cFDA+: non-permeabilized cells with enzymatic activity; PI+cFDA+: permeabilized cells with enzymatic activity; PI+cFDA-: permeabilized cells without enzymatic activity; PI-cFDA-: non-permeabilized cells without enzymatic activity; PI-BOX+: non-permeabilized and depolarized cells; PI+BOX+: permeabilized and depolarized cells; PI+BOX-: permeabilized and polarized cells; PI-BOX-: non-permeabilized and polarized cells.

^{A-E} Different capital letters in the same column indicate significant difference for the same strain and fruit juice at different storage time periods, based on Tukey's test ($p < 0.05$).

Table 3. Viable counts (Log CFU/mL) of *L. fermentum* 139 and *L. fermentum* 263 and sizes (%) of their subpopulations with different physiological characteristics in MRS broth and apple and orange juice when exposed to different steps of a simulated gastrointestinal digestion.

Substrate	Isolate	Digestion step	Viable count (Log CFU/mL)	Size of cell subpopulation (%)			
				PI-cFDA+	PI+cFDA-	PI-BOX+	PI+BOX-
MRS broth	<i>L. fermentum</i> 139	Mouth	8.9±0.2 ^A	86.8±1.9 ^A	11.6±0.3 ^C	25.1±0.3 ^A	33.2±5.0 ^D
		Stomach (pH 3.8)	8.3±0.4 ^A	47.8±0.5 ^C	15.3±0.5 ^C	12.4±0.5 ^B	39.2±0.8 ^C
		Stomach (pH 2.0)	8.5±0.3 ^A	45.9±1.6 ^C	21.2±0.9 ^A	10.0±0.3 ^C	65.2±1.1 ^B
		Duodenum	7.3±0.5 ^B	37.4±0.4 ^D	22.5±0.8 ^A	11.0±0.4 ^C	67.3±1.0 ^B
		Ileum	7.1±0.8 ^B	58.8±1.6 ^B	19.7±0.5 ^B	8.9±0.2 ^D	69.6±0.5 ^A
	<i>L. fermentum</i> 263	Mouth	8.4±0.7 ^A	78.6±0.9 ^A	6.9±0.9 ^D	30.9±0.7 ^A	14.5±0.9 ^E
		Stomach (pH 3.8)	8.6±0.3 ^A	60.5±0.8 ^B	9.1±0.7 ^C	23.56±0.3 ^B	25.8±1.0 ^D
		Stomach (pH 2.0)	8.0±0.1 ^A	63.8±1.3 ^B	14.3±0.4 ^B	20.2±0.5 ^C	59.9±1.3 ^C
		Duodenum	7.8±0.2 ^B	46.1±1.5 ^D	16.4±0.5 ^A	12.8±0.8 ^D	67.6±0.4 ^B
		Ileum	7.9±0.2 ^B	55.3±0.5 ^C	17.6±0.3 ^A	10.5±0.7 ^E	69.9±1.0 ^A
Apple juice	<i>L. fermentum</i> 139	Mouth	8.4±0.8 ^A	56.7±0.4 ^A	7.25±0.3 ^C	31.5±0.8 ^A	44.1±2.0 ^A
		Stomach (pH 3.8)	8.1±0.6 ^{AB}	45.6±1.8 ^B	10.9±0.4 ^B	28.2±0.5 ^B	39.4±4.0 ^A
		Stomach (pH 2.0)	5.4±0.4 ^C	39.9±0.2 ^C	13.7±0.8 ^A	27.1±0.8 ^B	38.5±3.0 ^A
		Duodenum	5.9±0.5 ^C	34.5±1.6 ^D	13.9±0.7 ^A	13.2±0.3 ^C	44.7±2.0 ^A
		Ileum	4.9±0.1 ^C	38.9±3.0 ^C	14.2±0.3 ^A	12.5±0.6 ^D	50.5±5.0 ^A
	<i>L. fermentum</i> 263	Mouth	8.2±0.6 ^A	62.9±3.6 ^A	9.5±0.9 ^B	37.8±0.3 ^A	30.1±0.3 ^E
		Stomach (pH 3.8)	8.1±0.4 ^A	35.2±0.4 ^D	14.5±0.3 ^A	20.0±0.4 ^B	46.9±1.2 ^D
		Stomach (pH 2.0)	6.4±0.3 ^B	37.2±0.6 ^C	14.8±0.5 ^A	15.2±0.4 ^C	50.9±0.6 ^C
		Duodenum	5.2±0.2 ^C	39.6±0.5 ^B	13.2±0.8 ^A	12.4±0.2 ^D	53.0±0.8 ^B
		Ileum	4.8±0.3 ^C	41.1±1.2 ^B	14.1±0.7 ^A	10.7±0.5 ^E	57.1±0.9 ^A
Orange juice	<i>L. fermentum</i> 139	Mouth	8.6±0.5 ^A	77.8±5.3 ^A	5.2±0.6 ^D	38.2±0.5 ^A	15.5±0.9 ^E
		Stomach (pH 3.8)	7.8±0.3 ^B	63.6±3.7 ^B	9.1±0.6 ^C	35.6±0.4 ^B	19.8±1.0 ^D
		Stomach (pH 2.0)	7.8±0.2 ^B	48.7±2.8 ^C	13.9±0.3 ^B	23.6±0.8 ^C	21.7±0.7 ^C
		Duodenum	5.7±0.2 ^C	34.9±1.0 ^E	14.9±0.4 ^A	13.8±0.9 ^D	32.7±2.0 ^B
		Ileum	4.8±0.3 ^C	38.6±1.0 ^D	15.0±0.5 ^A	10.1±0.4 ^E	46.8±1.0 ^A
	<i>L. fermentum</i> 263	Mouth	8.9±0.2 ^A	59.6±1.4 ^A	3.0±0.6 ^C	18.3±0.5 ^A	14.8±0.5 ^E
		Stomach (pH 3.8)	8.7±0.4 ^A	44.1±2.9 ^B	13.2±0.3 ^B	14.4±0.2 ^B	22.2±1.0 ^D
		Stomach (pH 2.0)	6.3±0.3 ^B	38.5±0.8 ^C	14.3±0.2 ^A	14.1±0.5 ^B	31.5±1.0 ^C
		Duodenum	5.9±0.6 ^C	33.0±0.9 ^E	14.8±0.5 ^A	10.4±0.6 ^C	47.7±0.7 ^B
		Ileum	5.1±0.2 ^C	36.1±0.8 ^D	14.9±0.7 ^A	10.2±0.2 ^C	50.3±0.6 ^A

PI-cFDA+: non-permeabilized cells with enzymatic activity; PI+cFDA+: permeabilized cells with enzymatic activity; PI+cFDA-: permeabilized cells without enzymatic activity; PI-cFDA-: non-permeabilized cells without enzymatic activity; PI-BOX+: non-permeabilized and depolarized cells; PI+BOX+: permeabilized and depolarized cells; PI+BOX-: permeabilized and polarized cells; PI-BOX-: non-permeabilized and polarized cells.

^{A-E} Different capital letters in the same column indicate significant difference for the same strain in the same fruit juice or MRS broth during steps of simulated digestion, based on Tukey's test ($p < 0.05$).

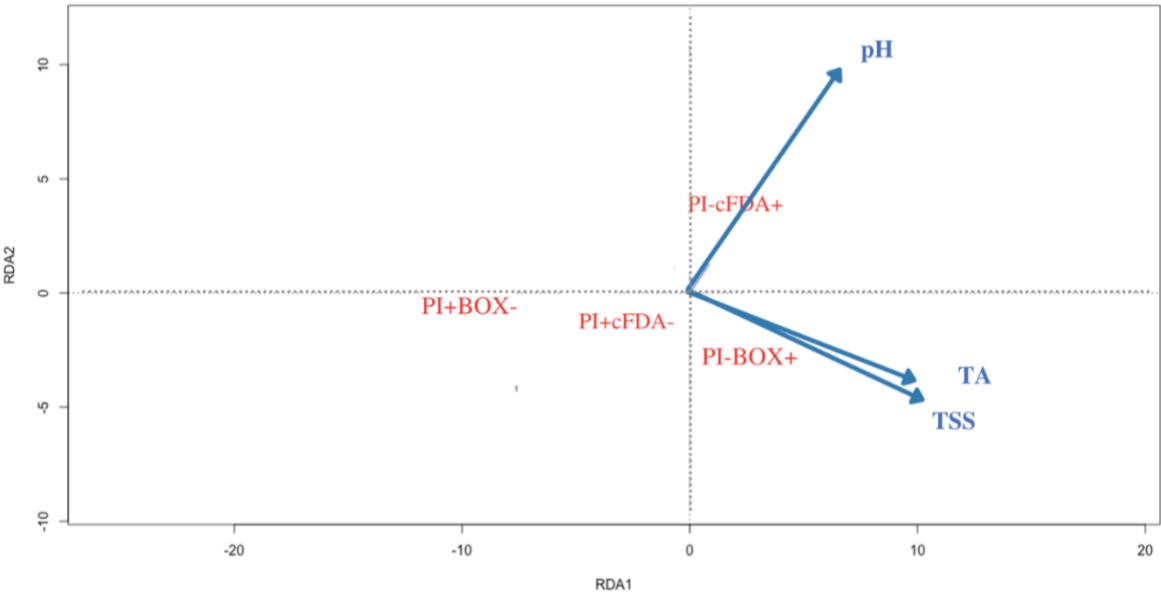


Figure 1.