



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

Í SIS MEIRELES MAFALDO

POTENCIAL DA BIOMASSA DE MICROALGAS
DULCÍCOLAS NA PROTEÇÃO DE CULTURAS
PROBIÓTICAS DURANTE LIOFILIZAÇÃO E
ARMAZENAMENTO

JOÃO PESSOA

2022

ÍSIS MEIRELES MAFALDO

**POTENCIAL DA BIOMASSA DE MICROALGAS DULCÍCOLAS NA
PROTEÇÃO DE CULTURAS PROBIÓTICAS DURANTE
LIOFILIZAÇÃO E ARMAZENAMENTO**

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

Orientador(a): Prof^a Dr^a Marciane Magnani

JOÃO PESSOA

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M187p Mafaldo, Ísis Meireles.

Potencial da biomassa de microalgas dulcícolas na
proteção de culturas probióticas durante liofilização e
armazenamento / Ísis Meireles Mafaldo. - João Pessoa,
2022.

65 f.

Orientação: Marciane Magnani.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Tecnologia de Alimentos. 2. Lactobacillus
acidophilus 5. 3. Lacticaseibacillus casei 1. 4.
Microalgas. 5. Liofilização. 6. Probióticos. I.
Magnani, Marciane. II. Título.

UFPB/BC

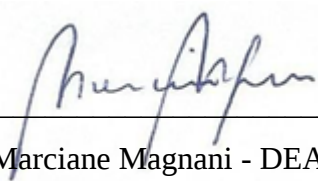
CDU 664(043)

Í SIS MEIRELES MAFALDO

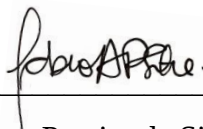
**POTENCIAL DA BIOMASSA DE MICROALGAS DULCÍCOLAS NA PROTEÇÃO
DE CULTURAS PROBIÓTICAS DURANTE LIOFILIZAÇÃO E
ARMAZENAMENTO**

Dissertação **APROVADA** em **03 / 03 / 2022**

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva - DGTA/CCHSA/UFPB
Examinador Interno



Profª Drª Tatiana Colombo Pimentel - IFPR
Examinador Externo

A minha família pelo carinho, amor e incentivo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Norma Meireles e Mafaldo Júnior, que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida, não há palavras que expressem meu agradecimento por vocês. Agradeço pelo esforço de ambos, por me apoiarem em diversas decisões, pela confiança, companheirismo, educação, carinho, por compreender minha ausência e todo o amor incondicional depositado a mim. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Ícaro e Irla, que sempre apoiaram minhas decisões, acreditaram e me incentivaram nas realizações de sonhos. A toda minha família pela paciência, amor e afeto. Vocês são essenciais para mim.

A Jerônimo, meu namorado, pelo carinho, amor, companheirismo, solidariedade, por me apoiar nas minhas decisões, trazer paz, alegria e distração na vida, por me aturar e acompanhar durante estes anos.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Marciane Magnani. Sou muito grata pelo acolhimento, confiança depositada em mim, por me orientar com muita paciência e generosidade, oferecendo desafios e oportunidades, além de todo apoio, atenção com minhas dúvidas e ensinamentos que foram muito importantes para mim.

Aos membros da banca avaliadora, Prof^a Dr^a Tatiana Colombo Pimentel e Prof. Dr. Fábio Anderson Pereira da Silva, por aceitarem o convite, pela atenção, correções e valiosas contribuições para este trabalho.

As minhas amigas do Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos (LPMA) Bianca, Elvira, Geany, Iara, Janne, Júlia, Karine, Mayara, Ruthchelly, Viviane e Winnie pelo conhecimento compartilhado, pelo apoio e amizade, auxílio e convivência durante experimentos, vocês foram fundamentais para mim. A Whyara por me inserir na microbiologia, pela paciência com meus diversos questionamentos, pelos ensinamentos, por me guiar durante experimentos, por toda ajuda prestada e amizade construída. A Jade, a minha parceira de laboratório, por todo o apoio e cumplicidade durante o mestrado, pela amizade e por todos os momentos de descontração durante as análises. A Maiara pela disposição e auxílio no desenvolvimento de alguns experimentos.

Aos meus amigos e colegas de turma do mestrado, pelas conversas, troca de experiências e convivência, por momentos de distração e alegria, mesmo em ambiente virtual.

Aos meus amigos (Roseli, Alice, Carolina, Jayme, Alany, Elizabeth, Gabriela, Trícia, Wilker, Igor, Heloise, Matheus e Larissa) que sempre estiveram ao meu lado durante toda

minha formação acadêmica, e que compreenderam os momentos de minha ausência pelo tempo dedicado aos estudos, mas que me apoiaram e me ajudaram sempre.

A todos os técnicos de laboratório e servidores da UFPB que prestaram auxílio em diversos momentos do meu mestrado. Muito obrigada pela disponibilidade, atenção, apoio e paciência para me ajudar.

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

Aos demais funcionários terceirizados da UFPB, em especial Ana Paula e Daniel, por todo apoio e descontração no LPMA.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta me apoiaram e contribuíram para a realização desta pesquisa.

Muito obrigada!

RESUMO

A liofilização é o método mais utilizado para a conservação de culturas probióticas. No entanto, danos à célula decorrentes do processo podem comprometer a viabilidade probiótica. O uso de mono-, di- e polissacarídeos que previnem a ruptura da membrana celular e protegem as células probióticas pode reduzir os danos durante a liofilização. Microalgas dulcícolas contêm em sua composição polissacarídeos não digeríveis que podem exercer tal proteção. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial das biomassas microalgais *Chlorella vulgaris* (CV), *Spirulina platensis* (SP), *Lagerheimia longiseta* (LL) e *Scenedesmus quadricauda* (SQ) como agentes protetores de culturas probióticas [*Lactobacillus acidophilus* 5 (La-5) e *Lacticaseibacillus casei* 1 (Lc-1)] durante a liofilização, armazenamento refrigerado (0, 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias a 4 °C) e exposição às condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI). A integridade da membrana foi avaliada em citômetro de fluxo utilizando iodeto de propídio e os aspectos ultraestruturais das células liofilizadas foram avaliados utilizando o microscópio eletrônico de varredura. Frutooligossacarídeos (FOS) e solução salina (SS) foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Foi observada uma redução de 1-2 log UFC/g ($p < 0,05$) após a liofilização das culturas com efeito protetor das biomassas variável entre as cepas probiótica e espécies de microalgas. Todas as biomassas de microalgas apresentaram efeito protetor ao longo armazenamento refrigerado, de 90 e 120 dias para La-5 e Lc-1, respectivamente. Após 120 dias de armazenamento refrigerado a biomassa de SP apresentou maiores contagens probióticas para La-5 (9,81 log UFC/g) enquanto para Lc-1 as maiores contagens foram observadas para a cultura liofilizada com SQ (9,08 log UFC/g) e FOS (9,33 log UFC/g) ($p < 0,05$). O probiótico La-5 foi mais resistente ao armazenamento refrigerado em relação ao Lc-01 ($p < 0,05$; redução de 1,1 vs 2,65 log UFC/g). Todas as biomassas de microalgas liofilizadas com ambas as culturas probióticas forneceram contagens superiores a 6,15 log UFC/g após digestão *in vitro*. A sobrevivência dos probióticos à digestão *in vitro* foi dependente da cepa e microalga utilizada, contudo a maior contagem foi observada para a cepa Lc-1 liofilizada com CV (7,3 log UFC/g). A utilização das biomassas SP, CV, LL resultou em menor dano à membrana (12,5 a 59,2%) em comparação ao FOS (53,9 a 61,3%) para ambas as culturas probióticas ($p < 0,05$). As micrografias mostraram a adesão de La-5 e Lc-1 às microalgas, além da formação de exopolissacarídeos para ambas as cepas liofilizadas com LL. Os resultados mostram o potencial da aplicação das biomassas de microalgas dulcícolas como protetores de culturas probióticas em especial para CV e SP.

Palavras-chave: *Lactobacillus acidophilus* 5; *Lacticaseibacillus casei* 1; microalgas; liofilização; prebióticos.

ABSTRACT

Freeze drying is a method most used for the conservation of probiotic cultures. However, cell damage resulting from the process may compromise probiotic viability. The use of mono-, di-, and polysaccharides that prevent cell membrane disruption and protect probiotic cells can reduce damage during freeze dried. Freshwater microalgae contain in their composition non-digestible polysaccharides that can exert such protection. The aim of this study was to evaluate the potential of the microalgal biomass *Chlorella vulgaris* (CV), *Spirulina platensis* (SP), *Lagerheimia longiseta* (LL) and *Scenedesmus quadricauda* (SQ) as protective agents of probiotic cultures [*Lactobacillus acidophilus* 5 (La-5) e *Lacticaseibacillus casei* 1 (Lc-1)] during freeze drying, refrigerated storage (0, 7, 15, 30, 60, 90 and 120 days at 4 °C) and simulated gastrointestinal conditions (SGIC). The membrane integrity was evaluated in a flow cytometer using propidium iodide and the ultrastructural aspects of the freeze-dried cells were evaluated using a scanning electron microscope. Fructooligosaccharides (FOS) and saline (SS) were used as positive and negative controls, respectively. A reduction of 1-2 log CFU/g ($p < 0.05$) was observed after freeze drying of the cultures, with a protective effect on biomass varying between probiotic strains and microalgae species. All microalgae biomass showed a protective effect during long refrigerated storage, of 90 and 120 days for La-5 and Lc-1, respectively. After 120 days of refrigerated storage, SP biomass showed the highest probiotic counts for La-5 (9.81 log CFU/g) while for Lc-1 the highest counts were observed for the freeze-dried culture with SQ (9.08 log CFU/g). g) and FOS (9.33 log CFU/g) ($p < 0.05$). The probiotic La-5 was more resistant to refrigerated storage than Lc-01 ($p < 0.05$; reduction of 1.1 vs 2.65 log CFU/g). All freeze-dried microalgae biomasses with both probiotic cultures provided counts greater than 6.15 log CFU/g after in vitro digestion. The survival of probiotics to in vitro digestion was dependent on the strain and microalgae used, however the highest count was observed for the Lc-1 strain freeze dried with CV (7.3 log CFU/g). The use of SP, CV, LL biomass resulted in less membrane damage (12.5 to 59.2%) compared to FOS (53.9 to 61.3%) for both probiotic cultures ($p < 0.05$). The micrographs showed the adhesion of La-5 and Lc-1 to the microalgae, in addition to the formation of exopolysaccharides for both strains freeze dried with LL. The results show the potential of the application of freshwater microalgae biomass as protectors of probiotic cultures, especially for CV and SP.

Key-words: *Lactobacillus acidophilus* 5; *Lacticaseibacillus casei* 1; microalgae; freeze drying; prebiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO

- Fig. 1.** Log reduction of viable of cell of *L. acidophilus* La-5 (A) and *L. casei* Lc-1 (B) freeze-dried with ●: saline solution (control), ■: Fructooligosaccharideo, ▲: *Chlorella vulgaris*, ○: *Spirulina platensis*, □: *Lagerheimia longiseta*, Δ: *Scenedesmus quadricauda* in storage at 4 °C. The error bars represent the standard deviations.....61
- Fig. 2.** Log reduction of viable of cell of *L. acidophilus* La-5 (A) and *L. casei* Lc-1 (B) freeze-dried with ●: saline solution (control), ■: Fructooligosaccharideo, ▲: *Chlorella vulgaris*, ○: *Spirulina platensis*, □: *Lagerheimia longiseta*, Δ: *Scenedesmus quadricauda* *in vitro* digestion. The error bars represent the standard deviations.....62
- Fig. 3.** Percentage of membrane damage of *L. acidophilus* 5 and *L. casei* 1 freeze-dried cells with saline solution (SS), fructooligosaccharideo (FOS), *Chlorella vulgaris* (CV), *Spirulina platensis* (SP), *Lagerheimia longiseta* (LL) and *Scenedesmus quadricauda* (SQ) after 120 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C). ^{a-f} Different lowercase letters in the same bar denotes difference ($p < 0.05$) among percentage of membrane damaged of *L. acidophilus* 5 after treatment freeze-drying. ^{A-F} Different capital letters in the same bar denotes difference ($p < 0.05$) among percentage of membrane damaged of *L. casei* 01 after freeze-drying treatment. * Denotes statistical difference ($p < 0.05$) between probiotic cells with the same freeze-drying treatment, based on the Tukey's test. Error bars represent standard deviation obtained using independent triplicates.....63
- Fig. 4.** Scanning electron micrograph of *L. acidophilus* 5 after freeze-dried with (A) saline solution, (B) Fructooligosaccharideo, (C) *Chlorella vulgaris*, (D) *Spirulina platensis*, (E) *Lagerheimia longiseta* and (F) *Scenedesmus quadricauda*.....64
- Fig. 5.** Scanning electron micrograph of *L. casei* 1 after freeze-dried with (A) saline solution, (B) Fructooligosaccharideo, (C) *Chlorella vulgaris*, (D) *Spirulina platensis*, (E) *Lagerheimia longiseta* and (F) *Scenedesmus quadricauda*.....65

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1. Viable cell counts of *Lactobacillus acidophilus* 05 and *Lacticaseibacillus casei* 01 after freeze-drying with fructooligosaccharides (FOS) or freshwater microalgae biomasses.....66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 CEPAS PROBIÓTICAS E APLICAÇÃO TECNOLÓGICA.....	15
2.2 CRIOPROTETORES UTILIZADOS NA LIOFILIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS	18
2.3 MICROALGAS DULCÍCOLAS	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 LOCAL DA PESQUISA	24
3.2 CULTIVOS E PRODUÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL	24
3.3 CEPAS TESTADAS E PREPARO DE INÓCULO.....	25
3.4 PROCEDIMENTO DE LIOFILIZAÇÃO.....	25
3.5 VIABILIDADE DE PROBIÓTICOS LIOFILIZADOS DURANTE ARMAZENAMENTO	26
3.6 VIABILIDADE DE PROBIÓTICOS LIOFILIZADOS DURANTE A DIGESTÃO <i>IN</i> VITRO.....	26
3.7 AVALIAÇÃO DE DANO NA MEMBRANA DE CEPAS PROBIÓTICAS LIOFILIZADAS	27
3.8 ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DAS CULTURAS TESTES LIOFILIZADAS	28
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
4 RESULTADOS	37
4.1 ARTIGO	37
SURVIVAL DURING LONG-TERM STORAGE, MEMBRANE INTEGRITY, AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> 05 AND <i>LACTICASEIBACILLUS CASEI</i> 01 FREEZE-DRIED WITH FRESHWATER MICROALGAE.....	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67

1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). Quando consumidos, os probióticos colonizam o trato gastrointestinal (TGI) proporcionando benefícios, como a melhoria na absorção de nutrientes e estimulação do sistema imunológico (TRIPATHI; GIRI, 2014). Para proporcionar efeitos desejáveis à saúde, recomenda-se a ingestão de uma concentração mínima de bactérias vivas de 10^6 UFC/g (SHU et al., 2018). Além disso, os probióticos precisam ser metabolicamente estáveis, com plena integridade das funções celulares e ativos tanto no alimento quanto no hospedeiro (CHARNCHAI et al., 2016; SANTOS et al., 2019). Particularmente, as espécies de bactérias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus acidophilus* 5 e *Lactocaseibacillus casei* 1, destacam-se entre as principais cepas probióticas comercializadas mundialmente e são indicadas para equilibrar a microbiota intestinal (VIJAYA KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

No entanto, a incorporação de culturas probióticas em matrizes alimentares enfrenta desafios na sobrevivência desses microrganismos devido a exposição às condições desfavoráveis impostas pelos processos industriais e armazenamento do produto, como baixo pH, temperatura elevada, presença de oxigênio, pressão osmótica, dentre outras (TRIPATHI; GIRI, 2014; LOPES et al., 2020). Ainda, durante a digestão os probióticos ficam susceptíveis a redução de células viáveis devido à elevada acidez do estômago, presença de sais biliares e enzimas digestivas (JIANG et al., 2022; RATHER et al., 2017).

Dentre os métodos de conservação aplicados às culturas probióticas com o objetivo de viabilizar sua ampla aplicação em alimentos, a liofilização é uma tecnologia difundida que tem se mostrado adequada. A liofilização possibilita a remoção de água das células bacterianas sem o uso de altas temperaturas, como aquelas empregadas durante a secagem convectiva (DA SILVA GUEDES, 2019; IACONELI et al., 2015; SHU et al., 2018). Este método de conservação permite a estabilidade dos probióticos por tempo prolongado de armazenamento. Entretanto, a formação de cristais de gelo que ocorre durante o congelamento da cultura, assim como a desidratação, podem causar ruptura da membrana celular e comprometer a viabilidade durante o armazenamento (TYMCZYSZYN et al., 2012).

O uso de substâncias capazes de proteger as células de injúrias por estresse mecânico ou osmótico na membrana tem sido uma estratégia utilizada pela indústria durante a liofilização (ROMANO et al., 2016a). Várias substâncias têm sido utilizadas com sucesso como agentes crioprotetores de culturas probióticas liofilizadas tais como sorbitol, ácido ascórbico e leite desnatado (BAGAD et al., 2017), mono e dissacarídeos, por exemplo, sacarose, lactose, frutose

e trealose (BASHOLLI-SALIHU et al., 2014), além de substâncias prebióticas, como frutooligossacarídeos (FOS) (ROMANO et al., 2016a), galactooligossacarídeos (GOS) (TYMCZYSZYN et al., 2012), e xilooligossacarídeos (XOS) (PALANIAPPAN; ANTONY; EMMAMBUX, 2021). Os polissacarídeos têm sido considerados crioprotetores por permitirem que as células se acomodem entre os espaços e a superfície de seu arranjo molecular, bem como por sua capacidade de formar um estado vítreo de baixa interação molecular (CHIU et al 2014). Estudos recentes relataram o FOS como um dos crioprotetores probióticos mais eficientes (BORA et al., 2018; LIAO et al., 2019).

A biomassa microalgal tem sido sugerida como ingrediente promissor para desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos, por se tratar de matéria-prima natural e ser “geralmente reconhecida como segura” (*Generally Recognized As Safe* - GRAS) (BARBA, 2017). Algumas espécies de microalgas dulcícolas como *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* já são comercializadas em cápsulas, comprimidos, pós e líquidos (ZHANG et al., 2020). A biomassa destas espécies de microalgas apresenta carboidratos, vitaminas, ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos e compostos bioativos com efeitos benéficos à saúde (ABU-TAWEEL et al., 2019; ENGLMAIEROVA et al, 2020; KOYANDE, 2019). Outras espécies de microalgas dulcícolas ainda não reconhecidas como GRAS, porém não produtoras de toxinas como *Scenedesmus quadricauda* e *Lagerheimia longiseta* são pouco exploradas comercialmente, embora sua composição também seja promissora (DE MEDEIROS et al., 2020; ENZING et al., 2014).

Estudos anteriores relataram propriedades prebióticas para biomassas das microalgas como *C. vulgaris*, *S. platensis* e *Desmodesmus maximus* (DE MEDEIROS et al., 2021a,b). Grande parte dos carboidratos presentes em microalgas dulcícolas está na forma de polissacarídeos não digeríveis no TGI, capazes de exercer efeitos positivos na microbiota intestinal (SONNENBURG; SONNENBURG, 2014). A composição polissacarídica das microalgas dulcícolas e as propriedades prebióticas já descritas para algumas espécies sugere potencial protetor frente culturas probióticas. Entretanto este conhecimento ainda é escasso. Considerando estes aspectos, os objetivos deste estudo foram: i) avaliar os efeitos de proteção da biomassa de microalgas dulcícolas (*C. vulgaris*, *S. platensis*, *L. longiseta* e *S. quadricauda*) em cepas probióticas (*L. acidophilus* 5 e *L. casei* 1) durante a liofilização, armazenamento refrigerado e digestão gastrointestinal *in vitro*; ii) verificar a integridade da membrana celular das células liofilizadas com biomassa de microalgas dulcícolas; iii) detectar os aspectos ultraestruturais das células liofilizadas com biomassa de microalgas dulcícolas. FOS e solução salina foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CEPAS PROBIÓTICAS E APLICAÇÃO TECNOLÓGICA

O gênero *Lactobacillus* foi descrito pela primeira vez em 1901 e até recentemente compreendia mais 250 espécies. Com base em análises moleculares e filogenéticas, o gênero foi taxonomicamente reorganizado em 23 novos gêneros relacionados, sendo que o novo gênero *Lactobacillus* inclui 38 espécies (DUAR et al, 2017; ZHENG et al, 2020). Considerando a nova nomenclatura, as principais espécies probióticas comercializadas mundialmente e amplamente estudadas na incorporação de alimentos são: *L. acidophilus*, *L. casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* e *Ligilactobacillus salivarius*, (JIANG et al., 2022; VIJAYA KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

Desde que o conceito de probióticos foi divulgado por Elie Metchnikoff em 1907, diversas definições foram propostas (MARTÍN; LANGELLA, 2019). A definição mais recente descreve probióticos como “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício a saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014). Para garantir os efeitos desejáveis a saúde, os alimentos probióticos devem conter contagem de células viáveis eficaz ao final do armazenamento do produto, a viabilidade pode variar entre as cepas. Recomenda-se um consumo de probióticos em uma contagem mínima de bactérias vivas de 10^6 UFC/g (SHU et al., 2018).

O consumo de probióticos desempenha potencial na regulação, equilíbrio e melhoria na saúde gastrointestinal e muitos gêneros de probióticos por exemplo *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, são encontrados na microbiota intestinal humana (JIANG et al., 2022). A ingestão adequada de probióticos pode impedir a proliferação de microrganismos patogênicos e seus efeitos, desta forma a microbiota intestinal compete por locais de adesão e nutrientes, prevenindo de doenças gastrointestinais (HALLORAN; UNDERWOOD, 2019). Além disto, os probióticos ajudam na manutenção da integridade da mucosa, na produção de importantes enzimas digestivas, estimulam o sistema imunológico na prevenção da diabetes, obesidade, hipercolesterolemia e câncer (DASARI et al., 2017; KRISTENSEN et al., 2016; RAZMPOOSH et al., 2019). A sobrevivência de probióticos durante a digestão gastrointestinal e adequada colonização intestinal está relacionada a cepa, já a eficácia do probiótico é influenciada pelo alimento e seus componentes (DE BELLIS; SISTO; LAVERMICOCCA, 2021).

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuídos na natureza, são anaeróbias, aerotolerantes, não formadoras de esporos, não patogênicas e têm resistência a pH relativamente baixo. Além disso, possuem propriedade de fermentar carboidratos em ácido láctico e seus produtos metabólicos finais são aplicados na indústria de alimentos (MOUAFO et al., 2022). As BAL são conhecidas pela produção de exopolissacarídeos (EPS), um produto metabólico primário (SOUFYA; NAMPOOTHIRI, 2021), relevante para aumentar seu uso em aplicações biotecnológicas (STOYANOVA et al., 2012), pois favorecem a adesão à superfície, a formação de biofilme na célula bacteriana, aumentam a resistência bacteriana ao estresse ambiental e sua produção contribui com as propriedades reológicas de produtos lácteos (RAJOKA et al., 2020; BHAT; BAJAJ, 2019). A natureza dos EPS depende da cepa bacteriana, condições de cultura e composição do meio de crescimento (OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020).

Devido a capacidade fermentativa, é comum o uso de BAL como culturas *starter* na fermentação de vegetais, produtos lácteos e cárneos. Os produtos lácteos são as matrizes alimentares mais utilizadas para adição de probióticos, dentre as espécies mais estudadas destaca-se *L. acidophilus* e *L. casei* (CHAMPAGNE; DA CRUZ; DAGA, 2018). *L. acidophilus* é uma das espécies mais conhecidas do antigo gênero *Lactobacillus*, é uma BAL, com estrutura morfológica Gram-positiva, não formadora de esporos, isolada de ambientes ácidos (OZOGUL; YAZGAN; OZOGUL, 2022). A cepa probiótica *L. acidophilus* 5 é amplamente comercializada na forma de suplemento e alimento. Seu consumo tem sido associado a manutenção da saúde intestinal e redução da biossíntese de colesterol (NAJARIAN; SHARIF; GRIFFITHS, 2019). Além disso, *L. acidophilus* 5 tem impactos positivos na regulação imunológica do hospedeiro (DE MEDEIROS et al., 2021b; ZHAO et al., 2020), efeitos benéficos como antioxidante, antihipercolesterolemia (MOURA et al., 2016), e anticarcinogênico (HEYDARI; RAHAIE; ALIZADEH, 2019).

L. casei é uma BAL, com estrutura morfológica Gram-positiva, heterofermentativa facultativa e anaeróbica aerotolerante com grande variabilidade de características fenotípicas e genotípicas. A cepa probiótica *L. casei* 1 é uma das espécies mais estudadas devido ao seu potencial de aplicação comercial, é tradicionalmente utilizada como cultura probiótica em produtos lácteos (PIMENTEL et al., 2021; ZHENG et al., 2020). Algumas cepas de *L. casei* são utilizadas como suplementações probióticas ou simbióticas para promover resultados benéficos à saúde (SHORI; BABA; MUNIANDY, 2019). O consumo regular de *L. casei* 1 tem impactos positivos na modulação da microbiota intestinal (CASAROTTI et al., 2020) e efeitos metabólicos para diminuir os impactos provocados por doenças crônicas como hipertensão e dislipidemia (BALTHAZAR et al., 2018; SPERRY et al., 2018).

Tradicionalmente, produtos contendo probióticos têm sido relacionados a laticínios, como iogurte, sorvete e queijo. Produtos lácteos fermentados são o principal veículo de probióticos, são bem aceitos pelos consumidores, não exigem mudanças na tecnologia e no processo de fabricação e podem proteger os probióticos das condições adversas do trânsito gastrointestinal (GOMAND et al., 2019). No entanto, existe uma crescente busca pela inserção de cepas probióticas em matrizes não-lácteas, devido ao aumento da conscientização por questões ambientais, interesse em dieta baseada em vegetais, bem-estar animal e papel da dieta na saúde além da nutrição básica. Além disso, existe uma demanda por parte dos consumidores que não gostam ou não podem consumir laticínios, incluindo pessoas que são intolerantes à lactose, alérgicas às proteínas do leite, hipercolesterolêmicas ou estritamente vegetarianas (SRISUKCHAYAKULA; CHARALAMPOPOULOS; KARATZAS, 2018).

A principal estratégia da indústria em substituição aos produtos lácteos probióticos tem sido a comercialização de extratos hidrosolúveis à base de vegetais como amêndoas, coco, grão-de-bico, aveia, arroz e soja, como substituto do leite (RINCON; BOTELHO; ALENCAR, 2020). Outros exemplos de alimentos vegetais incorporados de cepas probióticas são as frutas (RUSSO et al., 2015), sucos e outras bebidas à base de frutas e cereais (PIMENTEL et al., 2015; WEN et al., 2020; LOPES et al., 2020), smoothies de frutas (LUCIANO et al., 2018) e chocolate (KONAR et al., 2018). Em geral, frutas, hortaliças e cereais possuem elevados teores de açúcar, vitaminas e minerais, os quais poderiam ser usados como fonte de energia e nutrientes sendo substratos adequados para a sobrevivência dos probióticos (LILLO-PÉREZ et al., 2021). Porém, é um desafio para indústria de alimentos encontrar soluções tecnológicas para o desenvolvimento de probióticos incorporados a matrizes de origem vegetal, devido a restrições como baixo pH e presença de compostos fenólicos, os quais podem dificultar a viabilidade e estabilidade das bactérias probióticas (DE BELLIS; SISTO; LAVERMICOCCA, 2021; SRISUKCHAYAKULA; CHARALAMPOPOULOS; KARATZAS, 2018).

A sobrevivência probiótica é influenciada pelo alimento ao qual eles estão inseridos, que deve proteger as cepas para resistir as condições do trato gastrointestinais e apresentar maior viabilidade possível (DODOO et al., 2017). Assim, uma aplicação tecnológica adequada com viabilidade probiótica durante o armazenamento e consumo, possibilita o desenvolvimento de probióticos funcionais (BAKR, 2015). Contudo, a estabilidade das culturas probióticas durante a aplicação de tecnologias de conservação para produção de alimentos permanece como um desafio para a indústria alimentícia.

2.2 CRIOPROTETORES UTILIZADOS NA LIOFILIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS

O crescente interesse do consumidor por produtos alimentícios saudáveis tem motivado pesquisas para incorporar probióticos em diferentes matrizes alimentares (BAKR, 2015). Para isto, é necessário que as cepas probióticas destinadas à produção industrial tenham a capacidade de sobreviver e permanecer viáveis durante o processamento de alimentos, nos produtos formulados, no armazenamento e durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Desta forma, a manutenção da viabilidade durante as diferentes etapas da cadeia produtiva permanece um desafio na produção comercial de probióticos (LI et al, 2019; TRIPATHI; GIRI, 2014).

Os probióticos são comumente comercializados como culturas congeladas ou liofilizadas. As vantagens das culturas liofilizadas são a economia de espaço para armazenamento, conveniência no transporte e menor custo de energia para armazenamento em temperaturas ambiente e de refrigeração, o que favorece a sua comercialização direta ou a incorporação em matrizes alimentares (BASHOLLI-SALIHU et al., 2014; KONAR et al., 2016).

A liofilização é uma técnica amplamente utilizada para fornecer culturas iniciais altamente concentradas prontas para uso. Ainda, a liofilização permite a conservação durante armazenamento de longo prazo, pois remove com eficiência a água da célula bacteriana (GUL; CON; GUL, 2020). Esta tecnologia inclui três etapas: o congelamento da solução aquosa contendo as células, seguido por etapas de secagem por sublimação e dessorção da água (SHU et al., 2018). No entanto, a liofilização danifica as células devido a formação de cristais de gelo do congelamento, provoca lesão e ruptura na membrana resultante da alta osmolaridade, desnaturação do DNA e desestabilização das membranas bacterianas. Desta forma, o processo de liofilização pode comprometer proteínas estruturais e enzimas culminando com a perda da viabilidade das culturas probióticas liofilizadas (CUI et al., 2018; GUL; CON; GUL, 2020).

Diversas estratégias de proteção durante a liofilização são utilizadas para melhorar a estabilidade dos microrganismos probióticos, como o condicionamento pré-estresse das cepas bacterianas antes do congelamento (BRAVO FERRADA et al., 2015), mudanças nas condições de fermentação dos probióticos, condições de armazenamento e adição de crioprotetores (BARBOSA et al., 2015).

Os agentes crioprotetores são adicionados a solução celular antes da liofilização, e têm sido usados para minimizar o dano celular, reduzir a perda da viabilidade das células durante a liofilização e estabilizar a cultura probiótica durante o armazenamento de longo prazo (GUL; CON; GUL, 2020). Os crioprotetores aumentam a fração de descongelamento da matriz a ser liofilizada garantindo maior espaço para as células de probióticos, resultando em menores danos

celulares por estresse mecânico ou osmótico (SHU et al., 2018).

Geralmente, os crioprotetores contêm polissacarídeos, dissacarídeos (por exemplo, os açúcares, trealose, lactose, maltose), polímeros orgânicos, proteínas (por exemplo, caseína, proteína de soro de leite), aminoácidos, álcoois de açúcar e misturas complexas, como leite desnatado (CUI et al., 2018) ou ainda uma combinação entre essas diferentes substâncias, sendo adicionados em concentrações variáveis entre 5 e 30% (BAGAD et al., 2017; BROECKX et al., 2016).

Diversos estudos descrevem o uso de leite desnatado e açúcares como agentes crioprotetores para reduzir os danos causados pelas temperaturas de congelamento e liofilização (STEFANELLO et al., 2019). O efeito positivo demonstrado pelo leite desnatado pode ser devido à sua capacidade de fornecer uma camada de revestimento que protege as células do microrganismo durante a liofilização (STEPHAN; DA SILVA; BISUTTI, 2016). Por outro lado, o efeito crioprotetor dos açúcares é atribuído à sua eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento, pois reduzem o ponto de congelamento e minimizam a formação de gelo intercelular.

A capacidade protetora dos carboidratos pode ser explicada considerando duas hipóteses principais: vitrificação e reposição de água (CASSANI; GOMEZ-ZAVAGLIA; SIMAL-GANDARA, 2020). Geralmente, os carboidratos são utilizados com agentes crioprotetores devido à sua capacidade de formar estados amorfos ou vítreos, o que permite que as bactérias desidratadas permaneçam incorporadas à matriz vítrea com melhor estabilidade química e física (BROECKX et al., 2016). Polissacarídeos altamente polimerizados e fibras podem atuar como agentes protetores de culturas liofilizadas, pois aumentam a fração não congelada da matriz a ser liofilizada garantindo maior espaço para as células de probióticos e reduzindo os danos causados por estresses mecânicos e osmóticos (CHOTIKO; SHATIVEL, 2014; SHU et al., 2018).

Além disso, os compostos prebióticos tem sido relatados como compostos protetores de culturas probióticas (ROMANO et al., 2016; TYMCZYSZYN et al., 2012). Os prebióticos são substâncias usadas seletivamente por microrganismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde (GIBSON et al., 2017). As substâncias com propriedades prebióticas não são hidrolisadas na parte superior do TGI, desta forma, chegam intactas ao intestino, promovendo melhor crescimento e/ou atividade da microbiota (CASSANI; GOMEZ-ZAVAGLIA; SIMAL-GANDARA, 2020). Uma variedade de oligossacarídeos funcionais incluindo frutooligossacarídeos (FOS) (ROMANO et al., 2016a), xilooligossacarídeos (XOS) (PALANIAPPAN; ANTONY; EMMAMBUX, 2021), galactooligossacarídeos (GOS)

(TYMCZYSZYŃ et al., 2012), inulooligossacarídeos (IOS) e mananoligossacarídeos (MOS) estão sendo explorados como prebióticos (JANA et al., 2021).

O FOS tem sido sugerido como um dos melhores agentes de crioproteção de espécies de *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus* e *Limosilactobacillus* (BORA et al., 2018; LIAO et al., 2019 ROMANO et al., 2016a). FOS são quimicamente constituídos por oligossacarídeos de cadeia curta formados por unidades de frutose unidas por ligações glicosídicas em β (2 $\rightarrow$ 1) e podem ser obtidos pela síntese a partir da sacarose (ROMANO et al., 2016b). Bora et al. (2018) utilizaram o FOS em combinação com isolado proteico para encapsular *L. acidophilus* e *L. casei* submetidos a liofilização, o que permitiu maior sobrevivência das cepas após o armazenamento refrigerado, quando comparado com as células liofilizadas livres e maior estabilidade quanto à exposição das bactérias às condições gastrointestinais simuladas.

As matrizes poliméricas de diversas fontes têm sido sugeridas como protetoras de culturas probióticas. Da Silva Guedes et al. (2019) avaliaram a β -glucana de levedura descartada em cervejaria como agente protetor de culturas probióticas de *L. acidophilus* 05, *L. plantarum* 49 e *L.s plantarum* 201 durante a liofilização, armazenamento (4 °C, 120 dias) e digestão *in vitro*. Os pesquisadores observaram que a β -glucana atuou de maneira semelhante ao FOS após a liofilização, armazenamento (até 90 dias) e quando submetida a condições do trato gastrointestinal, no entanto, depois de 90 dias de armazenamento o FOS proporcionou maior proteção e resultou em células com menos danos à membrana.

Chotiko e Shatível (2014) estudaram o potencial protetor da fibra de farelo de arroz roxo (FAR) frente *L. plantarum* NRRL B-4496, e observaram que a FAR funcionou como uma matriz de fibras protegendo as células probióticas durante a liofilização e armazenamento. Chiu et al. (2014) investigaram o efeito protetor do polissacarídeo de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) em culturas de *Bifidobacterium longum* MYL16 durante os processos de liofilização e digestão *in vitro*, e observaram que a presença do polissacarídeo aumentou em 40% a viabilidade durante o armazenamento em relação às cepas liofilizadas sem a presença de protetores.

As biomassas de microalgas dulcícolas vêm sendo utilizadas para inúmeras aplicações comerciais (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2016) e tem sido sugeridas como ingredientes promissores para desenvolvimento de alimentos funcionais e nutracêuticos. Algumas espécies já são consumidas em forma de cápsulas, comprimidos e pós (ZHANG et al., 2020). Devido à composição polissacarídica das microalgas dulcícolas e as propriedades prebióticas já descritas para algumas espécies sugere-se sua utilização como crioprotetor frente culturas probióticas (DE MEDEIROS et al., 2021a,b).

2.3 MICROALGAS DULCÍCOLAS

As microalgas constituem um grupo diverso de microrganismos unicelulares capazes de realizar fotossíntese e podem ser encontradas em água doce (dulcícolas), salobra, em sistemas marinhos e em locais úmidos. O termo não possui conotação filogenética, visto que engloba diferentes grupos de organismos eucariontes como as clorofíceas (algas verdes) e procariontes como as cianobactérias, que pertencem ao domínio das bactérias. Porém, são consideradas microalgas por serem organismos fotossintetizantes (ENZING et al., 2014). As microalgas são uma fonte de compostos biologicamente ativos e podem ser utilizadas para o desenvolvimento de alimentos funcionais (ŚCIESZKA; KLEWICKA, 2020). Dentre os diversos componentes dietéticos da biomassa microalgal, as fibras insolúveis são de destacável importância já que não são digeridas ou absorvidas na parte superior do TGI e podem ser fermentadas pela microbiota intestinal (ÖZGÜN; UMU; DZUNZ, 2017). Em algumas espécies de microalgas, os polissacarídeos são componentes majoritários da biomassa, uma vez que são estruturas de reserva de energia presente nas paredes celulares. A concentração de polissacarídeos na célula varia entre gêneros e ou espécies, bem como com a fase de crescimento (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2016).

As microalgas são cultivadas comercialmente para produzir proteínas, pigmentos, lipídios, carotenoides, ácidos graxos polinsaturados, esteroides, vitaminas dentre outros compostos de interesse para aplicação em alimentos (RIZWAN et al, 2018; GARRIDO-CARDENAS et al, 2018; RÖSCH; ROßMANN; WEICKERT, 2019). A pesquisa de microalgas tem se concentrado na biotecnologia, para produzir aditivos e suplementos alimentares (RÖSCH; ROßMANN; WEICKERT, 2019; GARRIDO-CARDENAS et al, 2018), para produzir biofertilizante (RIZWAN et al, 2018) e para tratar águas residuais (GARRIDO-CARDENAS et al, 2018). Dentre as microalgas dulcícolas, as espécies *S. platensis* e *C. vulgaris*, já são utilizadas comercialmente em alimentos para fornecer compostos bioativos em suplementos dietéticos (ZHANG et al, 2020).

A *S. platensis* é considerada uma cianobactéria, filamentosa, coloração verde azulada, isolada de ambientes de água doce, com morfologia helicoidal provida de tricomas cilíndricos de até 100 µm de comprimento. Os organismos pertencentes a esta espécie são procariontes, com metabolismo fotoautotrófico (GUPTA et al., 2017). A *S. platensis* é classificada como “geralmente reconhecida como segura” (*Generally Recognized As Safe* - GRAS) pelo FDA (*Food and Drug Administration*). A biomassa de *S. platensis* é fonte de vitaminas, β-caroteno, minerais, clorofila, ácido gama-linolênico e proteínas (ABU-TAWEEL et al., 2019). O consumo regular da biomassa de *S. platensis* tem sido correlacionado com a prevenção de

diversas doenças como câncer, hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes (GUPTA et al., 2017).

Por sua vez, a espécie *C. vulgaris* é classificada como uma microalga unicelular, eucarionte, coloração verde, com morfologia celular com 2 a 10 µm de diâmetro, isolada de ambientes de água doce (dulcícola), classificada como GRAS e nomeada um “alimento verde saudável” pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (SAFI et al, 2014; ŚCIESZKA; KLEWICKA, 2020; YUAN et al., 2020). A *C. vulgaris* é a espécie usada na indústria devido ao seu alto teor de proteína e perfil balanceado de aminoácidos (CAPORGNO; MARTHYS, 2018). Além disso, contém carotenoides (β-caroteno, luteína e zeaxantina) (ENGLMAIEROVA et al, 2020), vitaminas e minerais (BLEAKLEY; HAYES, 2017), pigmentos, flavonoides e ácidos graxos (ácidos graxos ω-3 e ω-6) (KOYANDE, 2019). Devido a sua composição de bioativos, a biomassa de *C. vulgaris* tem sido sugerida como adjuvante no tratamento da hipertensão e colite ulcerativa, prevenção de doenças cardiovasculares, efeitos imunomoduladores, antioxidantes, anti-inflamatórios, antidiabéticos e antialérgicos (YUAN et al., 2020).

Pesquisas têm demonstrado potencial de incorporação da biomassa *S. platensis* e *C. vulgaris* em diversos produtos, como em macarrão, pães, biscoitos, barras nutritivas, sopas, sucos, bebida fermentada, iogurtes, ayran e kefir, entre outros (ASHOUSH; MAHDY, 2019; ATIK et al., 2021; BARKALLAH et al., 2017; FRADINHO et al., 2020; LAFARGA et al., 2019; NICCOLAI et al, 2019; PATEL et al., 2019; ŚCIESZKA; GORZKIEWICZ; KLEWICKA, 2021). Além disso, a biomassa da *S. platensis* tem sido aplicada para produzir substâncias bioativas que estimulam o crescimento de BAL, como *L. plantarum* (NICCOLAI et al, 2019).

Embora não sejam comumente utilizadas na fabricação de produtos lácteos probióticos, as microalgas verde-azuladas ou cianobactérias podem estimular com eficácia as bactérias probióticas (TURKMEN; AKAL; ÖZER, 2019). Os efeitos da suplementação da biomassa seca de *S. platensis* e *C. vulgaris* sobre a viabilidade de bactérias probióticas (*L. acidophilus* La-5, *Bifidobacterium lactis* BB-12, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) em iogurtes (0,25, 0,5 ou 1% de cada microalga) foram avaliados por Beheshtipour et al. (2012). Os pesquisadores relataram a adição das microalgas estimulou o crescimento de *L. acidophilus* e *B. lactis* no final da fermentação e durante o período de armazenamento (28 dias). Além disso, os tratamentos contendo 0,5 ou 1% de microalgas permitiram uma viabilidade de aproximadamente 10⁷ UFC/mL até o final do armazenamento refrigerado (5 °C).

Pesquisas com a incorporação de microalgas em alimentos fermentados, como iogurte, ayran e kefir, demonstram que a biomassa de *S. platensis* promove um aumento significativo no crescimento e atividade metabólica de *L. acidophilus* (ATIK et al., 2021; PATEL et al., 2019). Em seu estudo, Ścieszka e Klewicka (2020) avaliaram o efeito da microalga *C. vulgaris* na sobrevivência de cepas de *Lactobacillus brevis* (LOCK 0944, 0980, 0992 e MG451814) na presença de sais biliares durante 24 h (0,4% e 2,0%), fenol (0,4% e 1,5%) e em baixo pH (1,5, 2,0 e 2,5). A microalga aumentou as taxas de sobrevivência das cepas testadas na presença de sais biliares e incubação em 0,4% de fenol. Já o efeito da *C. vulgaris* em pH baixo variou com a cepa testada. A combinação de *L. brevis* LOCK 0944 e *C. vulgaris* para produção de uma bebida fermentada de soja resultou no aumento de células viáveis da cepa teste na bebida após 30 dias a 4 °C, além aumentar a sobrevivência das BAL a condições simuladas do TGI (ŚCIESZKA, S.; GORZKIEWICZ, M.; KLEWICKA, 2021).

Embora a maior parte dos estudos disponíveis na literatura tenha enfoque para biomassas de *S. platensis* e *C. Vulgaris*, existe uma diversidade de espécies de microalgas dulcícolas que permanecem pouco exploradas. A *Scenedesmus quadricauda* e *Lagerheimia longiseta* são microalgas dulcícolas não tóxicas pouco exploradas comercialmente (ENZING et al, 2014; DE MEDEIROS et al., 2020). A biomassa da *S. quadricauda* possui aproximadamente 42% de carboidratos (KHAN et al. 2021), enquanto a biomassa da *L. longiseta* possui aproximadamente 35% de carboidratos (CALIXTO et al., 2016), o que sugere potencial para proteção de culturas probióticas. Essas espécies podem ter oligossacarídeos e polissacarídeos (ENZING et al, 2014), ademais estudos anteriores já relataram as propriedades prebióticas de biomassas de microalgas (DE MEDEIROS et al., 2021a,b).

Dentre os diversos componentes dietéticos existentes na biomassa microalgal, as fibras insolúveis são de destacável importância já que não são digeridas ou absorvidas na parte superior do TGI e podem ser fermentadas pela microbiota intestinal (ÖZGÜN; UMU; DZUNZ, 2017). Em algumas espécies de microalgas, os polissacarídeos são componentes majoritários da biomassa, uma vez que são estruturas de reserva de energia presente nas paredes celulares. A concentração de polissacarídeos na célula varia entre gêneros e/ou espécies (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2016).

Apesar das microalgas serem uma excelente fonte alimentar, fornecerem compostos bioativos, contribuírem em relação aos benefícios à saúde, não existem estudos com a avaliação do potencial crioprotetor das biomassas de microalgas dulcíferas em culturas probióticas liofilizadas. Portanto, a avaliação desta crioproteção amplia as possibilidades de aplicações microalgas na indústria de alimentos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DA PESQUISA

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

3.2 CULTIVOS E PRODUÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

Foram estudadas quatro espécies de microalgas *Chlorella vulgaris* (CV), *Spirulina platensis* (SP), *Scenedesmus quadricauda* (SQ) e *Lagerheimia longiseta* (LL), isoladas de ambientes dulcícolas dos Estados da Paraíba e Rio Grande do Norte, mantidas na Coleção de Microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB). As biomassas foram obtidas pelo cultivo em meio sintético de WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) para as espécies CV, SQ e LL e meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) para a SP. As condições de cultivo foram 25 ± 1 °C, e iluminação de $4,5 \pm 0,5$ klx com lâmpadas fluorescentes de 40 W. Foi utilizado um fluorômetro (Turner-Design 10005R) para contagens de células e medições de fluorescência *in vivo*, que foram realizadas a cada 24 h até atingir a fase estacionária (aproximadamente 11-14 dias). A biomassa obtida para cada espécie foi centrifugada em temperatura refrigerada (3500 rpm, 15 min, 18 °C), congelada (-30 °C) e liofilizada a -55 ± 2 °C, pressão de vácuo < 138 µHg e velocidade de 1 mm/h utilizando um liofilizador de bancada (modelo L-101, Liotop, São Carlos, Brasil). As biomassas liofilizadas foram hermeticamente seladas em sacos de polietileno e armazenadas a -18 °C (DE MEDEIROS et al, 2021a).

3.3 CEPAS TESTADAS E PREPARO DE INÓCULO

As cepas probióticas *L. acidophilus* 5 (La-5) e *L. casei* 1 (Lc-1) foram obtidas Da Chr. Empresa Hansen SA (Valinhos, São Paulo). As culturas probióticas estoques foram mantidas em criotubos a -20 °C em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, India) contendo glicerol 20 mL/100 mL (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

Cada inóculo foi obtido preparando suspensões celulares de solução salina estéril (0,85 g/100 mL). Inicialmente, as cepas de La-5 e Lc-1 foram cultivadas em caldo MRS e incubadas a 37 °C por 24 h sob condições anaeróbicas (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda, Wade Road, UK) para obter o pré-inóculo. Posteriormente, o pré-inóculo foi adicionado a um novo caldo MRS (10 mL/100 mL) e re-incubado anaerobicamente a 37 °C por 24 h. As culturas foram obtidas/separadas por centrifugação ($4500 \times g$, 15 min, 4 °C) (modelo multifuge X1R, Termo Eletron Led GMBH, Osterode am Harz, Alemanha), lavadas duas vezes, ressuspensas em solução salina estéril para obter as soluções celulares e homogeneizadas usando um agitador vórtex (30 s) (modelo VX-38, Ionlab, Araucária, Brasil). A leitura de densidade óptica (DO) a 660 nm (DO_{660}) em espectrofotômetro UV-VIS (modelo DU-8200, Drawell, Chongqing, China) foi de 1,8 para fornecer contagens viáveis de aproximadamente $10 \log$ CFU/mL (GARCIA et al., 2018).

3.4 PROCEDIMENTO DE LIOFILIZAÇÃO

A biomassa microalgal de CV, SP, SQ, LL e FOS, foi assepticamente misturada com as suspensões celulares (10 g/100 mL), enquanto a solução salina (SS; 0,85 g/100 mL NaCl) foi utilizada como controle negativo. As suspensões contendo as células probióticas foram mantidas em repouso em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 1 h (GUERGOLETTTO, et. al., 2010) e em seguida, foram fracionadas em alíquotas de 1 mL, assepticamente transferidas para criotubos de 5 mL e congeladas a -20 °C por 24 h. A liofilização foi conduzida por 40 h a -55 ± 2 °C, sob pressão inferior a 138 μ Hg a uma velocidade de 1 mm/h usando um liofilizador de bancada (modelo L-101, Liotop, São Carlos, Brasil) (GARCIA et al., 2018). Após a liofilização, os criotubos foram fechados e embalados em sacos de polipropileno biaxialmente orientado (BOPP), hermeticamente selados e armazenados por 120 dias sob refrigeração ($4 \pm 0,5$ °C).

3.5 VIABILIDADE DE PROBIÓTICOS LIOFILIZADOS DURANTE ARMAZENAMENTO

A contagem de células viáveis de La-5 ou Lc-1 liofilizadas com CV, SP, SQ, LL, FOS e SS foram enumeradas em diferentes tempos de armazenamento refrigerado ($4 \pm 0,5$ °C), sendo eles: 0 (imediatamente após a liofilização), 7, 15, 30, 60, 90 e 120 dias. As células liofilizadas foram inicialmente reidratadas em 1 mL de água peptonada (0,1 g/100 mL) em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 30 min. (SANTOS et. al., 2014). Em seguida, alíquotas de 100 µL foram diluídas em série com solução salina (10^{-1} a 10^{-8}), plaqueadas em ágar MRS usando a técnica de inoculação por microgota (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001), incubadas a 37 °C por 48 h sob condições anaeróbicas (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) e as colônias foram enumeradas. A redução das contagens viáveis foi obtida usando $\log N/N_0$, onde N é contagem viável (UFC/g) das células liofilizadas em cada intervalo de tempo monitorado enquanto N_0 é a contagem viável (UFC/g) de células imediatamente após a liofilização (BARBOSA et al., 2015). O limite de detecção foi de 2 log UFC/mL.

3.6 VIABILIDADE DE PROBIÓTICOS LIOFILIZADOS DURANTE A DIGESTÃO *IN VITRO*

As células de La-5 ou Lc-1 liofilizadas com CV, SP, SQ, LL, FOS ou SS foram expostas a condições simuladas do TGI de acordo com o método descrito por Albuquerque et al. (2017) com algumas modificações. Os experimentos foram realizados em uma incubadora com agitação orbital shaker (modelo 6420, Thoth Equipamentos, Piracicaba, Brasil) a 37 °C para simular os movimentos peristálticos de cada etapa da digestão. Antes do ensaio, as células liofilizadas foram reconstituídas em 25 mL de caldo MRS por 15 min (CHAMPAGNE et. al., 2011). A fase do esôfago-estômago foi simulada usando 25 mg de pepsina diluída em 1 mL de 0,1 M/L HCl, adicionada a uma taxa de 0,05 mL/mL, com redução gradual do pH usando 1 M/L HCl (pH 5,5/10 min; pH 4,6/10 min; pH 3,8/10 min; pH 2,8/20 min; pH 2,3/20 min. e pH 2,0/20 min) sob agitação (130 rpm). A etapa do duodeno foi simulada com 2 g de pancreatina/L em 0,1 M/L de NaHCO_3 e 12 g sais biliares em 0,1 M/L NaHCO_3 com ajuste de pH para 5,0 usando 0,1 M/L NaHCO_3 e exposição por 30 min sob agitação (45 rpm); e as condições do íleo foram simuladas com o ajuste do pH para 6,5 usando 0,1 M/L NaHCO_3 , durando 60 min de exposição sob agitação (45 rpm).

As enzimas e sais de bile bovina foram adquiridas na Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Após cada etapa da simulação do TGI, uma alíquota de 100 µL de cada cepa foi recolhida,

diluída em série (10^{-1} a 10^{-8}), plaqueada em ágar MRS e incubada por 48 h a 37 °C sob condições anaeróbias (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). A redução da contagem de células viáveis foi obtida usando $\log N/N_0$, onde N é a contagem de células viáveis (UFC/mL) das cepas liofilizadas em cada passo digestivo, e N_0 é a contagem de células viáveis (UFC/mL) das cepas liofilizadas antes da digestão *in vitro*. O limite de detecção foi de 2 log UFC/mL.

3.7 AVALIAÇÃO DE DANO NA MEMBRANA DE CEPAS PROBIÓTICAS LIOFILIZADAS

Para medir a integridade da membrana das células de La-5 e Lc-1 liofilizadas com CV, SP, SQ, LL, FOS e SS, após 120 dias da liofilização e sob armazenamento refrigerado ($4 \pm 0,5$ °C), a suspensão das células de La-5 ou Lc-1 foram coradas com iodeto de propídio (PI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) com posterior leitura através de citometria de fluxo (CF) (DA SILVA GUEDES et al, 2019).

As células liofilizadas de cada cepa foram reidratadas (0,1 g/100 mL) em 5 mL de solução de fosfato tamponada estéril (PBS; 8,0 g/L NaCl, 0,20 g/L KCl, 1,44 g/L Na_2HPO_4 , 0,24 g/L KH_2PO_4 , pH 7,4), centrifugadas ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C), lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS para retirada das microalgas e obtenção da suspensão celular das cepas. Em seguida, alíquotas de 100 μL de cada suspensão celular foram incubadas com PI (1 $\mu\text{g/mL}$) por 5 min a 37 °C (DE SOUZA PEDROSA et al, 2020). Após a marcação, as células foram novamente centrifugadas ($4500 \times g$, 10 min, 4 °C), lavadas duas vezes para remover o excesso de corante e ressuspensas em PBS no mesmo volume (KIM; KIM; KANG, 2017).

A análise de CF foi realizada em citômetro de fluxo equipado com um laser de íons de argônio com emissão a 488 nm (BD Accuri C6, New Jersey, EUA). Os sinais de dispersão e fluorescência de células individuais passando pela zona do laser foram coletados como sinais logarítmicos. O canal FL3 (> 670 nm) foi usado para coletar a fluorescência vermelha do marcador PI. O nível de limite foi ajustado para SSC (luz de dispersão lateral) (30000) e FSC (luz de dispersão direta) (12.000) para eliminar ruído ou partículas (de detritos celulares) que eram muito menores do que as células intactas. Além disso, as células foram limitadas por parâmetros FSC/SSC. A aquisição das amostras foi operada em baixa taxa de fluxo (12 $\mu\text{L/min.}$) com um total de 10.000 eventos obtidos. Todos os citogramas foram gerados e analisados usando o software BD Accuri C6 (BD®, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

3.8 ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS DAS CULTURAS TESTES LIOFILIZADAS

Os aspectos ultraestruturais das células de La-5 e Lc-1 liofilizadas foram avaliados usando microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram pré-fixadas com glutaraldeído (2 mL/100 mL) por 2 h a 4 °C, pós-fixadas com 1 g/100 mL de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) por 30 min e aderidas a lamínulas revestidas com polilisina (CASARIN et al., 2016). As amostras foram desidratadas em etanol, secas até o ponto crítico com CO₂, revestidas com uma camada de ouro, 20 nm de espessura, e observadas em microscópio eletrônico de varredura EO 1430 VP (CARL ZEISS, Oberkochen, Germany).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios de contagem de células viáveis foram realizados em triplicata com resultados expressos como médias dos ensaios $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ou o teste t de Student, com a utilização do programa estatístico XLSTAT versão 2021.5 e as representações gráficas foram desenvolvidas por Graphpad Prism versão 8.0.1.

REFERÊNCIAS

- ABU-TAWEEL, G. M. et al. Spirulina consumption effectively reduces anti-inflammatory and pain related infectious diseases. **Journal of Infection and Public Health**, v. 12, n. 6, p. 777-782, 2019.
- ALBUQUERQUE, T. M. R. et al. *In vitro* characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts as potential probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 4, p. 704-716, 2017.
- ASHOUSH, I. S.; MAHDY, S. M. Nutritional Evaluation of Cookies Enriched with Different Blends of *Spirulina platensis* and *Moringa oleifera* Leaves Powder. **Journal of Food and Dairy Sciences**, v. 10, n. 3, p. 53-60, 2019.
- ATIK, D. S. et al. Development of vegan kefir fortified with *Spirulina platensis*. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101050, 2021.
- BAGAD, M. et al. Survivability of freeze-dried probiotic *Pediococcus pentosaceus* strains GS4, GS17 and *Lactobacillus gasseri* (ATCC 19992) during storage with commonly used pharmaceutical excipients within a period of 120 days. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 10, p. 921-929, 2017.
- BAKR, S. A. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 423-431, 2015.
- BALTHAZAR, C. F. et al. The addition of inulin and *Lactobacillus casei* 01 in sheep milk ice cream. **Food chemistry**, v. 246, p. 464-472, 2018.
- BARBA, F. J. Microalgae and seaweeds for food applications: Challenges and perspectives. **Food Research International**, v. 99, p. 969-970, 2017.
- BARBOSA, J. et al. Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 340-351, 2015.
- BARKALLAH, M. et al. Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. **LWT**, v. 84, p. 323-330, 2017.
- BASHOLLI-SALIHU, M. et al. Effect of lyoprotectants on β -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. **LWT-Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 276-282, 2014.
- BEHESHTIPOUR, H. et al. Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 4, p. 719-728, 2012.
- BHAT, B.; BAJAJ, B. K. Hypocholesterolemic potential and bioactivity spectrum of an exopolysaccharide from a probiotic isolate *Lactobacillus paracasei* M7. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 19, p. 100191, 2019.

BLEAKLEY, S.; HAYES, M. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. **Foods**, v. 6, n. 5, p. 33, 2017.

BORA, A. F. M. et al. Improved viability of microencapsulated probiotics in a freeze-dried banana powder during storage and under simulated gastrointestinal tract. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 4, p. 1330-1339, 2019.

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

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

CALIXTO, C. D. et al. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresource technology**, v. 221, p. 438-446, 2016.

CAPORGNO, M. P.; MATHYS, A. Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. **Frontiers in nutrition**, v. 5, p. 58, 2018.

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

CASAROTTI, S. N. et al. Probiotic low-fat fermented goat milk with passion fruit by-product: *In vitro* effect on obese individuals' microbiota and on metabolites production. **Food Research International**, v. 136, p. 109453, 2020.

CASSANI, L.; GOMEZ-ZAVAGLIA, A.; SIMAL-GANDARA, J. 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, p. 108852, 2020.

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

CHAMPAGNE, C. P.; DA CRUZ, A. G.; DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 160-166, 2018.

CHARNCHAI, P. et al. Effects of the food manufacturing chain on the viability and functionality of *Bifidobacterium animalis* through simulated gastrointestinal conditions. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. e0157958, 2016.

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

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

CUI, S. et al. Effect of acids produced from carbohydrate metabolism in cryoprotectants on the viability of freeze-dried *Lactobacillus* and prediction of optimal initial cell concentration. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 125, n. 5, p. 513-518, 2018.

DASARI, S. et al. Surfacing role of probiotics in cancer prophylaxis and therapy: A systematic review. **Clinical Nutrition**, v. 36, n. 6, p. 1465-1472, 2017.

DA SILVA GUEDES, J. et al. Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. **LWT**, v. 116, p. 108496, 2019.

DE BELLIS, P.; SISTO, A.; LAVERMICOCCA, P. Probiotic bacteria and plant-based matrices: An association with improved health-promoting features. **Journal of Functional Foods**, v. 87, p. 104821, 2021.

DE MEDEIROS, V. P. B. et al. Exploiting the use of agro-industrial residues from fruit and vegetables as alternative microalgae culture medium. **Food Research International**, v. 137, p. 109722, 2020.

DE MEDEIROS, V. P. B. et al. Freshwater microalgae biomasses exert a prebiotic effect on human colonic microbiota. **Algal Research**, v. 60, p. 102547, 2021a.

DE MEDEIROS, V. P. B. et al. *Spirulina platensis* biomass enhances the proliferation rate of *Lactobacillus acidophilus* 5 (La-5) and combined with La-5 impact the gut microbiota of medium-age healthy individuals through an *in vitro* gut microbiome model. **Food Research International**, p. 110880, 2021b.

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, p. 108837, 2020.

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

DUAR, R. M. et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, p. S27-S48, 2017.

ENGLMAIEROVA, M. et al. Effect of the alga *Chlorella vulgaris* alone and in combination with rapeseed oil on carotenoids and lipophilic vitamins in eggs. **European Poultry Science**, v. 84, 2020.

ENZING, C. et al. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. **JRC Scientific and policy reports**, p. 19-37, 2014

FRADINHO, P. et al. Effect of *Arthrospira platensis* (spirulina) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta. **Algal Research**, v. 45, p. 101743, 2020.

- 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.
- GARRIDO-CARDENAS, J. A. et al. Microalgae research worldwide. **Algal Research**, v. 35, p. 50-60, 2018.
- GOMAND, F et al. Food matrix design for effective lactic acid bacteria delivery. **Annual review of food science and technology**, 2019
- GUERGOLETTTO, K. B. et al. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 415-421, 2010.
- GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology**, v.8, p.10-14, 1972
- GUL, L. B.; CON, A. H.; GUL, O. Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation. **Cryobiology**, v. 96, p. 122-129, 2020.
- GUPTA et al. Prebiotic Efficiency of blue green algae on probiotics microorganisms. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 4, n. 4, p. 1-4, 2017.
- HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121-129, 2001.
- HEYDARI, Z.; RAHAIE, M.; ALIZADEH, A. M. Different anti-inflammatory effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in hepatocellular carcinoma cancer mouse through impact on micro RNAs and their target genes. **Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism**, v. 16, p. 100096, 2019.
- HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.
- IACONELLI, C. et al. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. **Journal of Biotechnology**, v. 214, p. 17-26, 2015.
- JANA, U. K. et al. Prebiotic manooligosaccharides: synthesis, characterization and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 342, p. 128328, 2021.
- JIANG, Z. et al. Recent advances in the design and fabrication of probiotic delivery systems to target intestinal inflammation. **Food Hydrocolloids**, p. 107438, 2021.
- KHAN, S. A. et al. Investigation of slow pyrolysis mechanism and kinetic modeling of *Scenedesmus quadricauda* biomass. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, p. 105149, 2021.

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

KRISTENSEN, N. B. et al. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. **Genome medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2016.

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

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

KOYANDE, A. K. et al. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 1, p. 16-24, 2019.

LAFARGA, T. et al. Effect of microalgae incorporation on the physicochemical, nutritional, and sensorial properties of an innovative broccoli soup. **LWT**, v. 111, p. 167-174, 2019.

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

LILLO-PÉREZ, S. et al. Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. **LWT**, v. 151, p. 112106, 2021.

LOPES, L. A. A. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 135, p. 109295, 2020.

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

MARTÍN, R.; LANGELLA, P. Emerging health concepts in the probiotics field: streamlining the definitions. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1047, 2019.

MOUAFO, H. T. et al. Biosurfactants from lactic acid bacteria: A critical review on production, extraction, structural characterization and food application. **Food Bioscience**, p. 101598, 2022.

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

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

NICCOLAI, A. et al. Lactic acid fermentation of *Arthrospira platensis* (spirulina) biomass for probiotic-based products. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 2, p. 1077-1083, 2019.

OLEKSY-SOBCZAK, M.; KLEWICKA, E.; PIEKARSKA-RADZIK, L. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains – Optimization of synthesis and extraction conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 122, p. 109055, 2020.

ÖZGÜN C. O.; UMU, K. R.; DZUNZ, B. D. Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.28, n. 1 2017.

OZOGUL, F.; YAZGAN, H.; OZOGUL, Y. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus acidophilus*. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p. 187-197, 2022.

PALANIAPPAN, A.; ANTONY, U.; EMMAMBUX, M. N. Current status of xylooligosaccharides: Production, characterization, health benefits and food application. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

PATEL, P. et al. Development of a carotenoid enriched probiotic yogurt from fresh biomass of *Spirulina* and its characterization. **Journal of food science and technology**, v. 56, n. 8, p. 3721-3731, 2019.

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

PIMENTEL, T. C. et al. Health benefits and technological effects of *Lactobacillus casei*-01: An overview of the scientific literature. **Trends in Food Science & Technology**, v. 114, p. 722-737, 2021.

RAJOKA, M. S. R. et al. *Lactobacillus* exopolysaccharides: New perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.

RATHER, S. A. et al. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. **LWT**, v. 83, p. 50-58, 2017.

RINCON, L.; BOTELHO, R. B. A.; DE ALENCAR, E. R. Development of novel plant-based milk based on chickpea and coconut. **LWT**, v. 128, p. 109479, 2020.

RIZWAN, M. et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018.

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

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

RÖSCH, C.; ROßMANN, M.; WEICKERT, S. Microalgae for integrated food and fuel production. **Gcb Bioenergy**, v. 11, n. 1, p. 326-334, 2019.

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

SAFI, C. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

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

ŚCIESZKA, S.; KLEWICKA, E. Algae *Chlorella vulgaris* as a factor conditioning the survival of *Lactobacillus* spp. in adverse environmental conditions. **LWT**, p. 109936, 2020.

ŚCIESZKA, S.; GORZKIEWICZ, M.; KLEWICKA, E. Innovative fermented soya drink with the microalgae *Chlorella vulgaris* and the probiotic strain *Levilactobacillus brevis* LOCK 0944. **LWT**, v. 151, p. 112131, 2021.

SHORI, A. B.; BABA, A. S.; MUNIANDY, P. Potential health-promoting effects of probiotics in dairy beverages. **Value-added ingredients and enrichments of beverages**. Academic Press, 2019. p. 173-204.

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

SONNENBURG, E. D.; SONNENBURG, J. L. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota - accessible carbohydrates. **Cell Metabolism Perspective**, v. 20, n. 5, p. 779-786, 2014.

SOUMYA, M. P.; NAMPOOTHIRI, K. M. An overview of functional genomics and relevance of glycosyltransferases in exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, p. 1014-1025, 2021.

SPERRY, M. F. et al. Probiotic Minas Frescal cheese added with *L. casei* 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women—A randomized double-blind pilot trial. **Journal of Functional Foods**, v. 45, p. 435-443, 2018.

SRISUKCHAYAKUL, P.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KARATZAS, K. A. Study on the effect of citric acid adaptation toward the subsequent survival of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in low pH fruit juices during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 111, p. 198–204, 2018.

STEFANELLO, R. F. et al. Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. **Food Research International**, v. 115, p. 90-94, 2019.

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

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

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

TURKMEN, N.; AKAL, C.; ÖZER, B. Probiotic dairy-based beverages: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 62-75, 2019.

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

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

WEN, J. et al. Effects of probiotic litchi juice on immunomodulatory function and gut microbiota in mice. **Food Research International**, v. 137, p. 109433, 2020.

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

YUAN, Q. et al. Isolation, structures and biological activities of polysaccharides from *Chlorella*: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 2199-2209, 2020.

ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une cyanophycee: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler**. Faculty of Science, Universite des Paris, Paris, 1966.

ZHANG, J. et al. Utilization of enzymatic cell disruption hydrolysate of *Chlorella pyrenoidosa* as potential carbon source in algae mixotrophic cultivation. **Algal Research**, v. 45, p. 101730, 2020.

ZHAO, W. et al. The immune regulatory role of *Lactobacillus acidophilus*: An updated meta-analysis of randomized controlled trials. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100656, 2020.

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.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO

SURVIVAL DURING LONG-TERM STORAGE, MEMBRANE INTEGRITY, AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* 05 AND *LACTICASEIBACILLUS CASEI* 01 FREEZE-DRIED WITH FRESHWATER MICROALGAE

Survival during long-term storage, membrane integrity, and ultrastructural aspects of *Lactobacillus acidophilus* 05 and *Lacticaseibacillus casei* 01 freeze-dried with freshwater microalgae

Abstract

This study aimed to assess *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda*, and *Lagerheimia longiseta* microalgae potential as a cryoprotective agent for probiotic cultures [(*Lactobacillus acidophilus* (La-5) and *Lacticaseibacillus casei* (Lc-01))] during freeze-drying, refrigerated storage (4 °C, 120 days), and *in vitro* simulated gastrointestinal conditions (SGIC). In addition, the occurrence of membrane damage and ultrastructural aspects of the cells were also verified. Fructooligosaccharides (FOS) were used as a positive control and saline solution as a negative control. The effect of cryoprotectants on probiotic survival depended on the probiotic culture and microalgae biomass. For La-5, all tested cryoprotectants reduced the probiotic viability loss during the freeze-drying process and storage (up to 90 days). *S. platensis* kept higher probiotic counts during refrigerated storage, while *C. vulgaris* protected the probiotic against the SGIC. *L. longiseta* decreased the membrane damage, mainly due to the production of exopolysaccharides, which was observed in the scanning electron microscopy (SEM). For Lc-01, all tested cryoprotectants reduced the probiotic viability loss during storage (up to 120 days). FOS and *S. quadricauda* protected the probiotic during freeze-drying and refrigerated storage, while *C. vulgaris* protected the probiotic against the SGIC and showed lower membrane damage, mainly due to physical protection observed in SEM. In conclusion, microalgae biomasses exerted similar or better cryoprotectant potential than FOS, a recognized cryoprotective agent.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*; *Lacticaseibacillus casei*; cryoprotectant; refrigerated storage, simulated gastrointestinal conditions.

1. Introduction

Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer health benefits on the host (Hill et al., 2014). In this way, probiotic cultures should be present in sufficient numbers upon administration, be metabolically stable, with complete integrity of cellular functions, and active in both the food and the host (dos Santos et al., 2019, Oluwatosin et al., 2022). *Lacticaseibacillus casei* - 01 (Lc-01) and *Lactobacillus acidophilus* La-5 (La-5) consumption has been associated with several health effects, such as prevention of cholesterol increase and control of insulin resistance (Brandão et al., 2021), reduction in postprandial glycemia (Grom et al., 2020), antihypertensive properties (Sperry et al., 2018), prevention of *Clostridiales difficile* infections (Najarian et al., 2019), among others.

Probiotic cultures may face several challenges for surviving industrial processes and product storage (Lopes et al., 2020) and to the conditions of the gastrointestinal tract, mainly the high acidity of the stomach and the presence of bile salts and enzymes (Rather et al., 2017). Freeze-drying is a widely used technology for producing dry probiotic powders. It removes water from bacterial cells without using high temperatures, allowing probiotic stability for a long time of storage (Da Silva Guedes, 2019). However, ice crystals may be formed during culture freezing and dehydration, causing cell membrane rupture and resulting in viability losses during the storage period (Romyasamit et al., 2021).

Cryoprotectants have been commonly used to avoid the loss of viability in freeze-dried probiotic cultures, as they may be capable of protecting cells from injuries by mechanical or osmotic stress on the membrane (Romano et al., 2016). Several compounds have been used as cryoprotective agents of freeze-dried probiotic cultures, such as skim milk (Oluwatosin et al., 2022), polyols (sorbitol, mannitol) (Jouki et al., 2021), mono and disaccharides (sucrose, fructose, trehalose, and lactose) (Yuste et al., 2021; Romyasamit et al., 2021), and prebiotic compounds (fructooligosaccharides (FOS), galactooligosaccharides (GOS), inulin, and xylooligosaccharides (XOS) (Chen et al., 2019; Palaniappan et al., 2021). Previous studies have

suggested FOS as one of the most efficient cryoprotectants for freeze-dried probiotic cultures (Bora et al., 2019; Liao et al., 2019). However, the cryoprotectant choice by manufacturers is still a challenge and depends on the availability, protection performance, cost, and final characteristics of the products (Oluwatosin et al., 2022).

Microalgae are excellent food sources, and some species have been already commercially used in food and dietary supplements, available as capsules, tablets, powders, and liquids, such as *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* (Zhang et al., 2020). According to the Food and Drug Administration (FDA), these species are classified as *Generally Recognized as Safe* (GRAS). In addition, their biomass presents nutrients, such as carbohydrates and vitamins, polyunsaturated fatty acids, pigments, and bioactive compounds, promoting health benefits (Englmaierova et al., 2020; Levasseur et al., 2020; Sathasivam et al., 2019). At the same time, *Scenedesmus quadricauda* and *Lagerheimia longiseta* are non-toxic freshwater microalgae species little commercially explored (de Medeiros et al., 2020). They may also contain oligosaccharides and polysaccharides (Enzing et al., 2014). Furthermore, previous studies have already reported the prebiotic properties of microalgae biomasses (de Medeiros et al., 2021a,b).

Similarities in composition and prebiotic properties between non-digestible carbohydrates and freshwater microalgae biomass suggest that the latter could be a cryoprotectant. However, as far as the authors know, no previous study evaluated the cryoprotectant potential of microalgae biomasses. Therefore, this study aimed to assess *S. platensis*, *C. vulgaris*, *S. quadricauda*, and *L. longiseta* microalgae potential as a cryoprotective agent for probiotic cultures (La-5 and Lc-01) during freeze-drying, refrigerated storage, and *in vitro* simulated gastrointestinal conditions (SGIC). In addition, the occurrence of membrane damage and ultrastructural aspects of the cells were also verified. Fructooligosaccharides (FOS) were used as a positive control and saline solution as a negative control.

2 Materials and Methods

2.1. Species, cultivation, and production of microalgae biomass.

Four freshwater microalgae, namely *C. vulgaris* (CV), *S. platensis* (SP), *S. quadricauda* (SQ), and *L. longiseta* (LL), isolated from freshwater environments in Paraíba and Rio Grande do Norte states (Brazil), and belonging to the culture collection of the Laboratory of Reef Environments and Biotechnology with Microalgae (LARBIM / Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil) were used. The CV, SQ, LL, and SP biomass were obtained by cultivation in WC and Zarrouk synthetic mediums, according to de Medeiros et al. (2020).

2.2. Tested strains and inoculum preparation

Lyophilized probiotics cultures of *L. acidophilus* 5 (La-5) and *L. casei* 01 (Lc-01) were obtained from the Chr. Hansen SA company (Valinhos, São Paulo). Stock cultures of the strains were maintained in cryovials at - 20 °C in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol 20% (v/v).

Each inoculum was obtained by preparing suspensions in sterile saline solution from overnight cultures grown on MRS broth (HiMedia, Mumbai, India) and incubated anaerobically (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK) at 37 °C to obtain the pre-inoculum. Subsequently, the pre-inoculum was added to a new MRS broth (10 mL/100 mL) and reincubated anaerobically at 37 °C for 24 h. Finally, cells were harvested by centrifugation ($4500 \times g$, 15 min, 4 °C) (multifuge X1R, Termo Electron Led GMBH, Osterode am Harz, Germany), washed twice, resuspended, and homogenized using a vortex (30 s) (VX-38, Ionlab, Araucária, Brazil) in sterile saline solution (0.85 g/100 mL) to obtain standard cell suspensions. The optical density (OD) reading at 660 nm (OD₆₆₀) in spectrophotometer UV-vis (model DU-8200, Drawell, Chongqing, China) was 1.8 to provide viable counts of approximately 10 log CFU/mL (Garcia et al., 2018).

2.3. Freeze-drying procedure

Each microalgal biomass (CV, SP, SQ, and LL) or FOS were aseptically mixed with the cell suspensions (10 g/100 mL), kept at rest at room temperature (25 ± 2 °C) for 1 h (Guergoletto et al., 2010), fractionated in 1 mL aliquots, aseptically transferred to cryotubes of 5 mL, and frozen at -20 °C for 24 h. The saline solution (SS; 0.85 g/100 mL NaCl) was the negative control. The freeze-drying process lasted 40 h (Garcia et al., 2018), and it was carried out at -55 ± 2 °C under a pressure of less than 138 μ Hg at a 1 mm/h using a bench-top lyophilizer (FreeZone, Labconco, Cansas, United States of America). After freeze-drying, cryotubes were closed and the dried probiotic powder packed in biaxially oriented polypropylene bags (BOPP), hermetically sealed, and stored under refrigeration (4 ± 0.5 °C). FOS was used as a positive control because it is recognized as one of the most suitable cryoprotectants (Romano et al., 2016).

2.4. Viability of freeze-dried probiotics during storage

Viable cells of freeze-dried La-5 or Lc-01 strains cultures with CV, SP, SQ, LL, FOS, or SS were enumerated at different storage times, as follows: 0 (immediately after freeze-drying), 7, 15, 30, 60, 90, and 120 days. The freeze-dried cells were initially rehydrated in peptone water (0.1 g/100 mL) at room temperature (25 ± 2 °C) for 30 min (Santos et al., 2014). Then, aliquots (100 μ L) were serially diluted at SS (10^{-1} to 10^{-8}) and plated on MRS agar using the micro drop inoculation technique (Herigstad et al., 2001). Finally, plates were incubated at 37 °C for 48 h under anaerobic conditions (using Anaerobic System Anaerogen, Oxoid), and colonies were enumerated. The reduction of viable counts was obtained using $\log N/N_0$, where N is the viable count (CFU/g) of freeze-dried cells at each monitored time interval. At the same time, N_0 is the viable count (CFU/g) of cells immediately after freeze-drying (Barbosa et al., 2015).

2.5. Viability of freeze-dried probiotics during in vitro digestion

Viable cells of freeze-dried La-5 and Lc-01 with CV, SP, SQ, LL, FOS, or SS were evaluated after exposure to simulated gastrointestinal tract conditions according to the method described by de Albuquerque et al. (2018) with some modifications. The experiments were carried out in an incubator with an orbital shaker (model 6420, Thoth Equipamentos, Piracicaba, Brazil) at 37 °C to simulate the peristaltic movements of each digestive step. Before the assay, the freeze-dried cells were reconstituted in MRS broth (25 mL; 15 min) (Champagne et al., 2011). The esophagus-stomach phase was simulated using 25 mg of pepsin diluted in 1 mL of 0.1 M/L HCl, added at a rate of 0.05 mL/mL, with a gradual reduction in pH using 1 M/L HCl (pH 5.5/10 min; pH 4.6/10 min; pH 3.8/10 min; pH 2.8/20 min; pH 2.3/20 min and pH 2.0/20 min) under stirring (130 rpm). The duodenum step was simulated with 2 g of pancreatin/L in 0.1 M/L of NaHCO₃ and 12 g of bile salts in 0.1 M/L NaHCO₃ with pH adjustment to 5.0 using 0.1 M/L NaHCO₃ and exposure for 30 min under agitation (45 rpm). Ileum conditions were simulated by adjusting the pH to 6.5 using 0.1 M/L NaHCO₃, lasting 60 min of exposure under agitation (45 rpm). Enzymes and bovine bile salts were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). After each simulation step, a 100 µL aliquot of each strain was collected, serially diluted, plated on MRS agar, and incubated for 48 h at 37 °C under anaerobic conditions (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). The reduction in viable cell count was obtained using log N/N₀, as described by Barbosa et al. (2015). The detection limit was 2 log CFU/mL.

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

The membrane integrity of La-5 and Lc-01 freeze-dried cells with CV, SP, SQ, LL, FOS, or SS was evaluated after 120 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C). For that, the cell suspensions of La-5 and Lc-01 were stained with propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA) with subsequent reading through flow cytometry (Da Silva Guedes et al., 2019).

Each freeze-dried strain cell was rehydrated (0.1 g/100 mL) in buffered phosphate sterile solution (PBS, 5 mL; pH 7.4), centrifuged ($4500 \times g$; 4 °C; 10 min), washed twice, and resuspended in PBS to remove the microalgae and obtain the cell suspension of the strains. Next, aliquots (100 µL) of each suspension were incubated with PI (1 µg/mL) for 5 min at 37 °C (De Souza Pedrosa et al., 2020). After staining, cells were centrifuged ($4500 \times g$; 4 °C; 10 min), washed twice to remove dye excess, and resuspended in PBS (Kim et al., 2017).

The flux cytometer analysis was performed using a flow cytometer equipped with an argon-ion laser with 488 nm excitation (BD Accuri C6, New Jersey, USA). Scatter and fluorescence signals from individual cells passing through the laser zone were collected as logarithmic signals. The FL3 channel (> 670 nm) was used to collect the red fluorescence of the PI marker. The threshold level was adjusted to side scattering light (SSC) (30000) and direct scattering light (FSC) (12,000) to eliminate noise or particles (from cell debris) that were much smaller than intact probiotic cells. Furthermore, cells were delimited by FSC/SSC parameters. Each sample acquisition was operated at a low flow rate (12 µL/min) with 10,000 acquired events. All cytograms were generated and analyzed using BD Accuri C6 software (BD®, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.7. Freeze-dried probiotics ultrastructural aspects

Freeze-dried La-5 and Lc-01 ultrastructural aspects were evaluated using scanning electron microscopy (SEM). First, the samples were pre-fixed with glutaraldehyde (2 mL/100 mL) for 2 h at 4 °C, post-fixed with 1 g/100 mL of osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 30 min and adhered to poly-lysine-coated coverslips (Casarin et al., 2016). Finally, the samples were dehydrated in ethanol, dried to a critical point with CO₂, coated with a gold

layer, 20 nm thick, and observed in an EO 1430 VP scanning electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.8. Reproducibility and statistical analysis

Viable cell count assays were expressed as means and standard deviation of three independent experiments performed in triplicate. In addition, statistical analysis was performed to determine significant differences ($p < 0.05$) using Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's test or Student's t-test, using the statistical program XLStat version 2021.5, and the graphic representations were developed at Graphpad Prism version 8.0.1.

3. Results and discussion

3.1. Influence of cryoprotectants on the survival of probiotics during freeze-drying

The effects of different cryoprotectants on viable counts of probiotic strains after freeze-drying are shown in Table 1. A reduction ($p < 0.05$) of 1-2 log CFU/g was observed after freeze-drying. The decrease in probiotic counts during this conservation process is influenced by low temperatures, ice crystal formation, and mechanical damage, in addition to stress conditions of bacterial strains imposed by high osmolarity during freezing (Archacka et al., 2019).

The effect of cryoprotectants on probiotic survival to freeze-drying was dependent on the probiotic culture and microalgae biomass type. For La-5, all tested cryoprotectants (FOS, CV, SP, LL, and SQ) reduced the probiotic viability loss (0.8-1.03 log CFU/g higher than SS, $p < 0.05$) during the freeze-drying process ($p < 0.05$), without differences among them ($p > 0.05$). Therefore, the freshwater microalgae biomasses exerted a similar cryoprotectant potential to FOS. For Lc-01, only FOS, LL, and SQ exerted cryoprotectant potential against the freeze-drying process ($p < 0.05$), while CV and SP showed similar probiotic counts to SS ($p > 0.05$). Therefore, the addition of cryoprotective agents is an alternative to increase cell viability

and minimize the adverse effects caused by the freeze-drying process (Gul et al., 2020), and the effect of microalgae biomass was dependent on the microalgae type. Cryoprotectants can inhibit extracellular and intracellular ice formation due to the ability to bind water, resulting in improved probiotic counts (Capela et al., 2006). Furthermore, they may absorb on the cell surface, resulting in a dense layer, partial water efflux from the cell, inhibition of ice crystal growth, and maintenance of the structure of ice amorphous in the proximity of the cell. Finally, oligosaccharides present in microalgae biomasses may have penetrated the probiotic cell wall and induced plasmolysis of cells before freezing, providing mechanical protection (Savedboworn et al., 2019).

3.2. Influence of cryoprotectants on the survival of probiotics during storage

The effects of different cryoprotectants on viable counts of probiotic strains during refrigerated storage are shown in Figure 1. The effect of cryoprotectants on probiotic survival depended on the probiotic culture and microalgae biomass type. For La-5, all freshwater microalgae and FOS showed cryoprotective effects during 90 days of storage, with lower probiotic losses (0.15-0.88 log CFU/g) compared to control (SS, 1.1 logs CFU/g, $p < 0.05$). SP showed the best performance, keeping initial probiotic viability constant for up to 30 days, increased probiotic counts after 60 days of storage, and no significant differences up to 120 days ($p > 0.05$). Therefore, SP kept higher probiotic counts (1.1 log CFU/g higher than SS) for 120 days of refrigerated storage, demonstrating its cryoprotectant ability. FOS and SQ also maintained higher probiotic counts (0.42-0.64 log CFU/g higher than SS) during 120 days of refrigerated storage ($p < 0.05$). On the other hand, CV and LL showed lower probiotic counts at the storage time-end than SS ($p < 0.05$). For Lc-01, all freshwater microalgae and FOS showed cryoprotective effects during 120 days of storage, with lower probiotic losses (0.55-1.72 log CFU/g) compared to control (SS, 2.65 logs CFU/g, $p < 0.05$). SQ and FOS showed the

best performance, resulting in higher probiotic counts at the end of storage time, followed by SP, LL, and CV ($p < 0.05$).

FOS is composed of fructose units linked by β -2-1 linkages, resulting in the protection of the probiotic lipid membranes and the formation of a vitreous state (Romano et al., 2016). Carbohydrate polymers have been considered the best cryoprotectants due to their ability to form an amorphous or glassy state, allowing dehydrated bacteria to remain embedded in the vitreous matrix with better chemical and physical stability during storage (Broeckx et al., 2016). Furthermore, FOS may be used by probiotic cultures as a carbon source (Capela et al., 2006). Microalgae biomasses also have monosaccharides (rhamnose, glucose, xylose, fucose, galactose, and fructose), oligosaccharides, and phenolic compounds that can be used by probiotic cultures, which could be associated with the higher probiotic survival during storage (de Medeiros et al., 2021a). Differences in the chemical composition of microalgae biomasses and the type of probiotic strain may explain the higher protection of SP for La-5 and SQ for Lc-01. SP shows high concentrations of nystose and raffinose as oligosaccharides and rhamnose as a sugar (de Medeiros et al., 2021a). Furthermore, it has a high concentration of phenolic compounds, such as epicatechin, chlorogenic acid, and myricetin (de Medeiros et al., 2021a). Some probiotic cultures prefer D3 oligosaccharides, such as raffinose (Ose et al., 2018), which may be the case of La-5 in this study. On the other hand, *Scenedesmus* species have wall constituted primarily by glucose, mannose and galactose (Takeda, 1996), which is efficiently used by Lc-01 through T6p pathway and PTSgal (Wu & Shah, 2017). In addition, SQ has high content of fatty acids (de Medeiros et al., 2020), well-known by the protective effects toward probiotic bacteria, minimizing the effects of exposure to stressors besides an improved cell viability (Dayangaç & Erdem, 2017).

We observed that La-5 was more resistant to refrigerated storage, resulting in lower probiotic losses (1.1 log CFU/g) compared to Lc-01 (2.65 logs CFU/g) ($p < 0.05$). Probiotic

cultures have different survival capabilities to environmental conditions, which are commonly related to the cell wall's genotype properties and/or composition (da Silva Guedes et al., 2019).

3.3. Influence of cryoprotectants on the survival of probiotics during *in vitro* digestion

Microalgae proved to be good cryoprotectants during *in vitro* digestion of freeze-dried probiotic cultures since control strains showed a more significant decrease in viable counts (up to 5 logs CFU/g) than freeze-dried with CV, SP, LL, SQ, and FOS (1.6-3.3 log CFU/G, Fig. 2 A-B). In a general view, after exposure to SGIC, both freeze-dried probiotic cultures with freshwater microalgae (CV, SP, LL, and SQ) provided counts of 6.15 - 7.36 log CFU/g, freeze-dried with FOS showed counts of 6.39 - 6.98 log CFU/g and control presented 4.51 - 5.61 log CFU/g. Therefore, only freeze-dried probiotics with cryoprotectants had counts higher than the suggested minimum to ensure desirable health effects in products with probiotics (> 6 log CFU/g) (Shu et al., 2018). The results indicate that the damages caused by freeze-drying and subsequent storage resulted in cells susceptible to the low pH values and digestive enzymes of the SGIC. In this way, probiotic cultures could not recover viability when included in SS (da Silva Guedes et al., 2019). On the other hand, the environmental impact was reduced in FOS and microalgae biomass.

The effect of cryoprotectants on probiotic survival depended on the probiotic culture and microalgae biomass type. After the esophagus-stomach phase, La-5 counts did not show significant differences ($p > 0.05$), regardless of the cryoprotectant used. However, at the end of *in vitro* digestion (ileum), La-5 counts were higher in the presence of FOS (2.44 log CFU/g higher than SS, $p < 0.05$), demonstrating more excellent protection. The microalgae (CV, SP, LL, and SQ) also protected the probiotic cells (1.6-1.8 log CFU/g higher than SS, $p < 0.05$), without significant differences among them (Fig 2A, $p > 0.05$). For Lc-01, at the end of *in vitro* digestion (ileum), probiotic counts were higher in the presence of CV (1.75 log CFU/g higher than SS, $p < 0.05$), followed by SP and LL (0.9-1.3 log CFU/g higher than SS, $p < 0.05$), and

FOS and SQ (0.7 log CFU/g higher than SS, $p < 0.05$). In this way, CV, SP, and LL provided better protection when compared to control and FOS.

3.4. *Measurements of damage in the membrane in freeze-dried probiotic cells*

The cryoprotective effects of CV, SP, LL, SQ, and FOS in reducing membrane damage of freeze-dried probiotics are shown in Figure 3. After 120 days of refrigerated storage, all microalgae provided lower percentages of membrane damage than the control (SS, $p < 0.05$) for both probiotic cultures. However, the effect of cryoprotectants on probiotic membrane damage depended on the probiotic culture and microalgae biomass type. For La-5, LL provided the lowest membrane damage (13.4%), followed by SP (42.2%), CV (59.2%), FOS (61.3%), and SQ (69.2%) ($p < 0.05$). In this way, reductions of 13 to 69% of membrane damage could be achieved using cryoprotectants. On the other hand, for Lc-01, CV provided the lowest membrane damage (12.5%), followed by LL (23.8%), SP (41.2%), FOS (53.9%) and SQ (70.2%) ($p < 0.05$). In this way, reductions of 16 to 74% of membrane damage could be achieved using cryoprotectants. Therefore, the microalgae biomass (except SQ) provided lower membrane damage than FOS for both probiotic cultures ($p < 0.05$).

Damaged membranes can compromise the functions and survival of bacterial cells (da Silva Guedes et al., 2019), which may explain the cryoprotectant potential of some microalgae biomass. In our study, higher La-5 viabilities were observed in the presence of SP biomass during storage, which could be associated with the lower membrane damage observed. At the same time, the highest survival of Lc-01 to SGIC in the CV may be related to the decreased membrane damage. However, in other cases, great membrane damage did not influence the probiotic viability during storage, such as for La-5 and Lc-01 in the presence of SQ. These results suggest that intrinsic characteristics of probiotic strains may affect the cryoprotective effects on probiotics (Tymczyszyn et al., 2012). Furthermore, they indicate that probiotic cultures could recover viability, even if some membranes are damaged.

3.5. Ultrastructural aspects of freeze-dried probiotic cells

For control, free bacterial cells were observed with saline solution (Fig. 4A e Fig. 5A). The micrographs show the adhesion of the probiotics La-5 (Fig. 4 A-F) and Lc-01 (Fig. 5 A-F) to the cryoprotective agents. Furthermore, cells showed integrity of the structure and homogeneous binding. In this way, cell surface adhesion and agglomeration of probiotic and microalgae strains (CV, SP, LL, and SQ) contributed to achieving the cryoprotective effects observed during freeze-drying and storage. The closely combined cells indicate that adequate protection occurred using cryoprotectants (Shu et al., 2018). In this way, microalgae biomass formed a coating that protected the probiotic cells allocated throughout the matrix (Sayedboworn et al., 2019). A more robust physical protection was observed for CV in Lc-01 (Fig. 5C), corroborating the lower membrane damage observed for this biomass and the highest survival to SGIC.

Micrographs also showed that La-5 and Lc-01 freeze-dried with LL produced exopolysaccharides (EPS) (Fig. 4E e Fig. 5E). EPS production was also evidenced for brewer's yeast β -glucans freeze-dried with *L. plantarum* 201 (Da Silva Guedes et al., 2019). EPS increases surface adhesion biofilm formation in the bacterial cell and act as a nutrition source during starvation (Rajoka et al., 2020). Therefore, the adhesion of probiotics to microalgae and the formation of EPS can protect the cell membrane of the probiotics and may be correlated to the high probiotic viability during storage for both probiotics and lower membrane damage in La-5.

4. Conclusion

This study was the first to assess the cryoprotectant potential of microalgae biomasses (*S. platensis*, *C. vulgaris*, *S. quadricauda*, and *L. longiseta*) for probiotic cultures (La-5 and Lc-01) during freeze-drying, refrigerated storage, and *in vitro* SGIC. Microalgae biomasses exerted similar or better cryoprotectant potential than FOS, a recognized cryoprotective agent, and the

results were strain-specific. For La-5, *S. platensis* and *C. vulgaris* showed better performances, resulting in higher probiotic counts during refrigerated storage and SGIC, respectively. For Lc-01, FOS, *S. quadricauda*, and *C. vulgaris* showed better performances, protecting the probiotic during freeze-drying and refrigerated storage, and SGIC, respectively. Microalgae biomasses' protective effect may be associated with probiotic adhesion to them and exopolysaccharides production. The results suggest that microalgae biomasses could be used as cryoprotectants, resulting in dry probiotic powders with suitable probiotic viabilities ($> 6 \log \text{CFU/g}$) during refrigerated storage for 120 days and after SGIC. The results are essential for expanding the knowledge and industrial application of freshwater microalgae biomass in probiotic cultures as a food ingredient and revealing non-used microalgae species, such as *S. quadricauda*.

Acknowledgments

The authors would like to thank “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES - Brazil Finance - Code 001) for the scholarship granted to the lead author (Mafaldo, Í. M.), and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico”.

References

- Archacka, M., Białas, W., Dembczyński, R., Olejnik, A., Sip, A., Szymanowska, D., Celińska, E., Jankowski, T., Olejnik, A., & Rogodzińska, M. (2019). Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. *Food Chemistry*, 274, 733-742.
- Barbosa, J., Borges, S., Amorim, M., Pereira, M. J., Oliveira, A., Pintado, M. E., & Teixeira, P. (2015). Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *Journal of Functional Foods*, 17, 340-351.

- Bora, A. F. M., Li, X., Zhu, Y., & Du, L. (2019). Improved viability of microencapsulated probiotics in a freeze-dried banana powder during storage and under simulated gastrointestinal tract. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(4), 1330-1339.
- Brandão, L. R., de Brito Alves, J. L., da Costa, W. K. A., Ferreira, G. D. A. H., de Oliveira, M. P., da Cruz, A. G., de Andrade Braga, V, de Souza Aquino, J., Vidal, H., Noronha, M. F., Cabral, L., Pimentel, T. C. & Magnani, M. (2021). Live and ultrasound-inactivated *Lactocaseibacillus casei* modulate the intestinal microbiota and improve biochemical and cardiovascular parameters in male rats fed a high-fat diet. *Food & Function*, 12, 5287-5300.
- Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International journal of pharmaceutics*, 505(1-2), 303-318.
- Capela, P., Hay, T. K. C., & Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39(2), 203-211.
- Casarin, L. S., de Oliveira Casarin, F., Brandelli, A., Novello, J., Ferreira, S. O., & Tondo, E. C. (2016). Influence of free energy on the attachment of *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on stainless steels AISI 304 and AISI 316. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 131-138.
- Champagne, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International journal of food microbiology*, 149(3), 185-193.
- Chen, H., Tian, M., Chen, L., Cui, X., Meng, J., & Shu, G. (2019). Optimization of composite cryoprotectant for freeze-drying *Bifidobacterium bifidum* BB01 by response surface methodology. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 1559-1569.

- da Silva Guedes, J., Pimentel, T. C., Diniz-Silva, H. T., da Cruz Almeida, E. T., Tavares, J. F., de Souza, E. L., Garcia, E. F., & Magnani, M. (2019). Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic lactobacilli. *LWT*, 116, 108496.
- Dayangaç, A., & Erdem, B. (2017). The metabolic relationships between probiotics and fatty acids. *Acta Phys. Pol. A*, 132, 816-818.
- 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. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(4), 704-716.
- de Medeiros, V. P. B., Pimentel, T. C., Varandas, R. C. R., Dos Santos, S. A., de Souza Pedrosa, G. T., da Costa Sassi, C. F., da Conceição, M. M., & Magnani, M. (2020). Exploiting the use of agro-industrial residues from fruit and vegetables as alternative microalgae culture medium. *Food Research International*, 137, 109722.
- de Medeiros, V. P. B., de Souza, E. L., de Albuquerque, T. M. R., da Costa Sassi, C. F., dos Santos Lima, M., Sivieri, K., Pimentel, T. C., & Magnani, M. (2021a). Freshwater microalgae biomasses exert a prebiotic effect on human colonic microbiota. *Algal Research*, 60, 102547.
- de Medeiros, V. P. B., Salgaço, M. K., Pimentel, T. C., da Silva, T. C. R., Sartoratto, A., dos Santos Lima, M., da Costa Sassi, C. F., Mesa, V., Magnani, M., & Sivieri, K. (2021b). *Spirulina platensis* biomass enhances the proliferation rate of *Lactobacillus acidophilus* 5 (La-5) and combined with La-5 impact the gut microbiota of medium-age healthy individuals through an *in vitro* gut microbiome model. *Food Research International*, 110880.

- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 334, 108837.
- dos Santos, A. S., de Albuquerque, T. M. R., de Brito Alves, J. L., & de Souza, E. L. (2019). Effects of quercetin and resveratrol on *in vitro* properties related to the functionality of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Frontiers in microbiology*, 10, 2229.
- Englmaierova, M., Marounek, M., Skrivan, M., & Duskova, D. (2020). Effect of the alga *Chlorella vulgaris* alone and in combination with rapeseed oil on carotenoids and lipophilic vitamins in eggs. *European Poultry Science*, 84.
- Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., & Sijtsma, L. (2014). Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *JRC Scientific and policy reports*, 19-37.
- 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(13), 5000-5010.
- Grom, L. C., Rocha, R. S., Balthazar, C. F., Guimarães, J. T., Coutinho, N. M., Barros, C. P., Pimentel, T. C., Venâncio, E. L., Collopy Junior, I. Maciel, P. M. C., Silva, P. H. F., Granato, D., Freitas, M. Q., Esmerino, E. A., & Cruz, A. G. (2020). Postprandial glycemia in healthy subjects: Which probiotic dairy food is more adequate? *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1110-1119.
- Guergoletto, K. B., Magnani, M., San Martin, J., de Jesus Andrade, C. G. T., & Garcia, S. (2010). Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 415-421.

- Gul, L. B., Con, A. H., & Gul, O. (2020). Storage stability and sourdough acidification kinetic of freeze-dried *Lactobacillus curvatus* N19 under optimized cryoprotectant formulation. *Cryobiology*, 96, 122-129.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of microbiological methods*, 44(2), 121-129.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506-514.
- Jouki, M., Khazaei, N., Rezaei, F., & Taghavian-Saeid, R. (2021). Production of synbiotic freeze-dried yoghurt powder using microencapsulation and cryopreservation of *L. plantarum* in alginate-skim milk microcapsules. *International Dairy Journal*, 105133.
- Kim, D. K., Kim, S. J., & Kang, D. H. (2017). Bactericidal effect of 266 to 279 nm wavelength UVC-LEDs for inactivation of Gram positive and Gram negative foodborne pathogenic bacteria and yeasts. *Food Research International*, 97, 280-287.
- Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology advances*, 41, 107545.
- Liao, N., Luo, B., Gao, J., Li, X., Zhao, Z., Zhang, Y., Ni, Y., & Tian, F. (2019). Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnology letters*, 41(2), 263-272.
- Lopes, L. A. A., Pimentel, T. C., Carvalho, R. D. S. F., Madruga, M. S., de Sousa Galvão, M., Bezerra, T. K. A., Barão, C. E., Magnani, M., & Stamford, T. C. M. (2021). Spreadable goat Ricotta cheese added with *Lactobacillus acidophilus* La-05: Can

- microencapsulation improve the probiotic survival and the quality parameters? *Food Chemistry*, 346, 128769.
- Najarian, A., Sharif, S., & Griffiths, M. W. (2019). Evaluation of protective effect of *Lactobacillus acidophilus* La-5 on toxicity and colonization of *Clostridium difficile* in human epithelial cells *in vitro*. *Anaerobe*, 55, 142-151.
- Oluwatosin, S. O., Tai, S. L., & Fagan-Endres, M. A. (2021). Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic—towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic. *Biotechnology Reports*, e00696.
- Ose, R., Hirano, K., Maeno, S., Nakagawa, J., Salminen, S., Tochio, T., & Endo, A. (2018). The ability of human intestinal anaerobes to metabolize different oligosaccharides: Novel means for microbiota modulation? *Anaerobe*, 51, 110-119.
- Palaniappan, A., Antony, U., & Emmambux, M. N. (2021). Current status of xylooligosaccharides: Production, characterization, health benefits and food application. *Trends in Food Science & Technology*.
- Rajoka, M. S. R., Wu, Y., Mehwish, H. M., Bansal, M., & Zhao, L. (2020). *Lactobacillus* exopolysaccharides: New perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. *Trends in Food Science & Technology*, 36-48.
- Rather, S. A., Akhter, R., Masoodi, F. A., Gani, A., & Wani, S. M. (2017). Effect of double alginate microencapsulation on *in vitro* digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 50-58.
- Romano, N., Schebor, C., Mobili, P., & Gómez-Zavaglia, A. (2016). Role of mono-and oligosaccharides from FOS as stabilizing agents during freeze-drying and storage of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Food Research International*, 90, 251-258.

- Romyasamit, C., Saengsuwan, P., Boonserm, P., Thamjarongwong, B., & Singkhamanan, K. (2021). Optimization of cryoprotectants for freeze-dried potential probiotic *Enterococcus faecalis* and evaluation of its storage stability. *Drying Technology*, 1-10.
- Santos, M. I., Gerbino, E., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E. E., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Stability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in the presence of galacto-oligosaccharides and lactulose as determined by near infrared spectroscopy. *Food Research International*, 59, 53-60.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2019). Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi journal of biological sciences*, 26(4), 709-722.
- Savedboworn, W., Teawsomboonkit, K., Surichay, S., Riansa-Ngawong, W., Rittisak, S., Charoen, R., & Phattayakorn, K. (2019). Impact of protectants on the storage stability of freeze-dried probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Food science and biotechnology*, 28(3), 795-805.
- Shu, G., Wang, Z., Chen, L., Wan, H., & Chen, H. (2018). Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 70-76.
- Sperry, M. F., Silva, H. L., Balthazar, C. F., Esmerino, E. A., Verruck, S., Prudencio, E. S., Neto, R. P. C., Tavares, M. I. B., Peixoto, J. C., Nazzaro, F., Rocha, R. S., Moraes, J. Gomes, A. S. G., Raices, R. S. L., Silva, M. C., Granato, D., Pimentel, T. C., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G. (2018). Probiotic Minas Frescal cheese added with *L. casei* 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women – A randomized double-blind pilot trial. *Journal of Functional Foods*, 45, 435-443.

- Takeda, H. (1996). Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry*, 42(3), 673-675.
- Tymczyszyn, E. E., Sosa, N., Gerbino, E., Hugo, A., Gómez-Zavaglia, A., & Schebor, C. (2012). Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 217-221.
- Wu, Q., & Shah, N. P. (2017). The potential of species-specific tagatose-6-phosphate (T6P) pathway in *Lactobacillus casei* group for galactose reduction in fermented dairy foods. *Food Microbiology*, 62, 178–187.
- Yuste, A., Arosemena, E. L., & Calvo, M. (2021). Study of the probiotic potential and evaluation of the survival rate of *Lactiplantibacillus plantarum* lyophilized as a function of cryoprotectant. *Scientific Reports*, 11(1), 1-8.
- Zhang, J., He, Y., Luo, M., & Chen, F. (2020). Utilization of enzymatic cell disruption hydrolysate of *Chlorella pyrenoidosa* as potential carbon source in algae mixotrophic cultivation. *Algal Research*, 45, 101730.

Figure captions

Fig. 1. Log reduction of viable of cell of *L. acidophilus* La-05 (A) and *L. casei* Lc-01 (B) freeze-dried with ●: saline solution (control), ■: Fructooligosaccharideo, ▲: *Chlorella vulgaris*, ○: *Spirulina platensis*, □: *Lagerheimia longiseta*, Δ: *Scenedesmus quadricauda* in storage at 4 °C. The error bars represent the standard deviations.

Fig. 2. Log reduction of viable of cell of *L. acidophilus* La-05 (A) and *L. casei* Lc-01 (B) freeze-dried with ●: saline solution (control), ■: Fructooligosaccharideo, ▲: *Chlorella vulgaris*, ○: *Spirulina platensis*, □: *Lagerheimia longiseta*, Δ: *Scenedesmus quadricauda* in vitro digestion. The error bars represent the standard deviations.

Fig 3. Percentage of membrane damage of *L. acidophilus* 05 and *L. casei* 01 freeze-dried cells with saline solution (SS), fructooligosaccharideo (FOS), *Chlorella vulgaris* (CV), *Spirulina platensis* (SP), *Lagerheimia longiseta* (LL) and *Scenedesmus quadricauda* (SQ) after 120 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C). ^{a-f} Different lowercase letters in the same bar denotes difference ($p < 0.05$) among percentage of membrane damaged of *L. acidophilus* 05 after treatment freeze-drying. ^{A-F}. Different capital letters in the same bar denotes difference ($p < 0.05$) among percentage of membrane damaged of *L. casei* 01 after freeze-drying treatment. * Denotes statistical difference ($p < 0.05$) between probiotic cells with the same freeze-drying treatment, based on the Tukey's test. Error bars represent standard deviation obtained using independent triplicates.

Fig. 4. Scanning electron micrograph of *L. acidophilus* 05 after freeze-dried with (A) saline solution, (B) Fructooligosaccharideo, (C) *Chlorella vulgaris*, (D) *Spirulina platensis*, (E) *Lagerheimia longiseta* and (F) *Scenedesmus quadricauda*.

Fig. 5. Scanning electron micrograph of *L. casei* 01 after freeze-dried with (A) saline solution, (B) Fructooligosaccharideo, (C) *Chlorella vulgaris*, (D) *Spirulina platensis*, (E) *Lagerheimia longiseta* and (F) *Scenedesmus quadricauda*

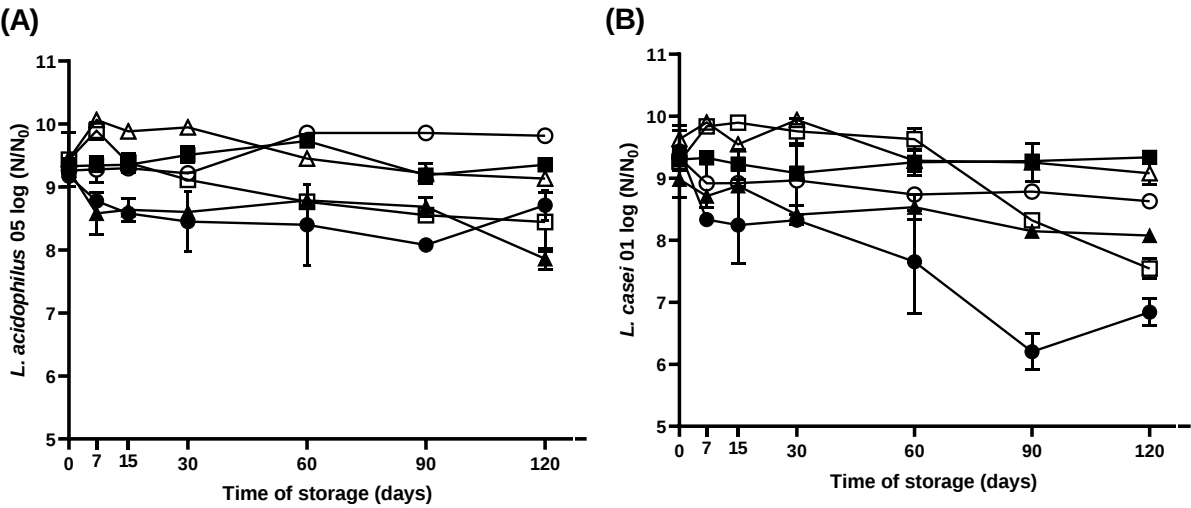


Fig. 1

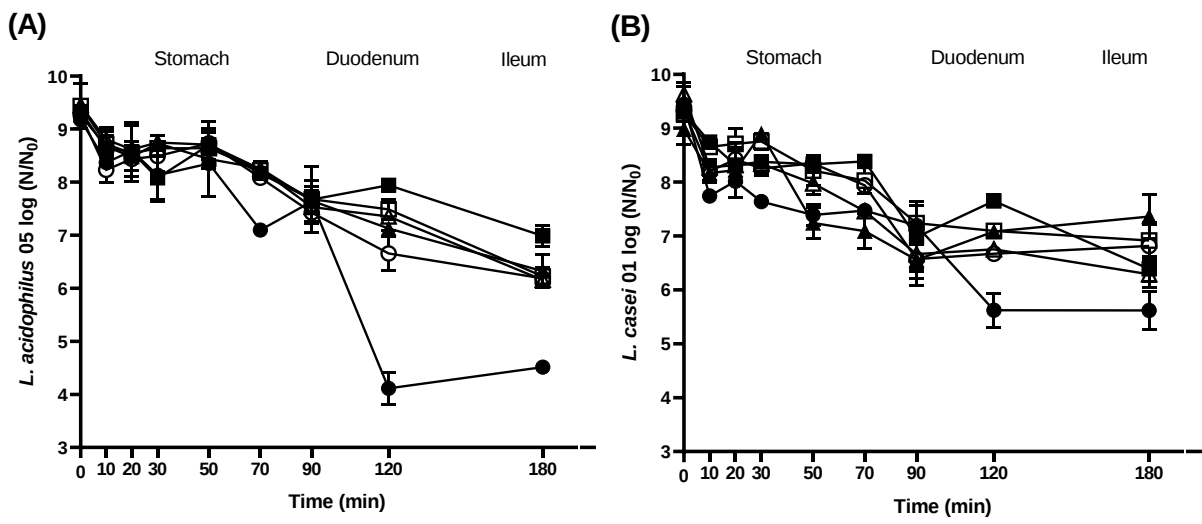


Fig. 2

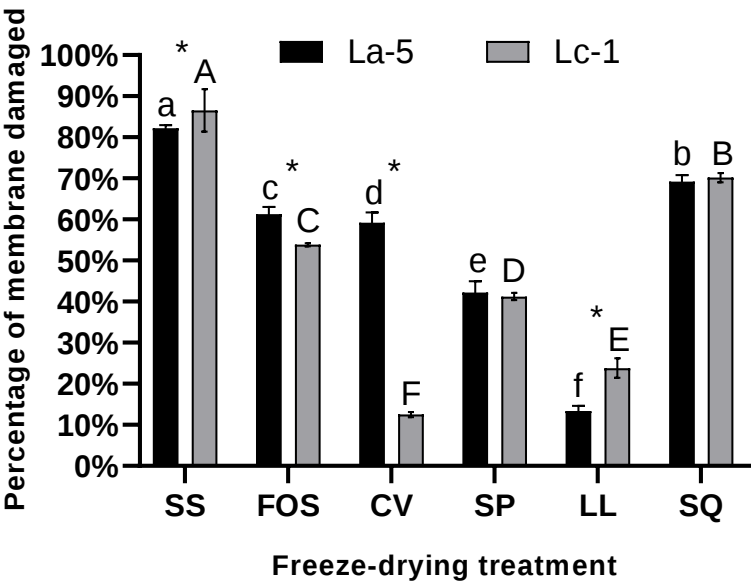
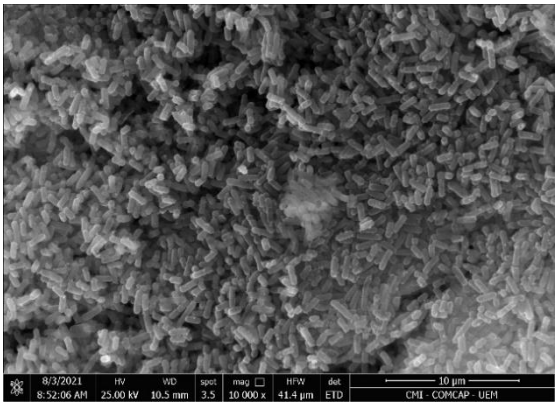
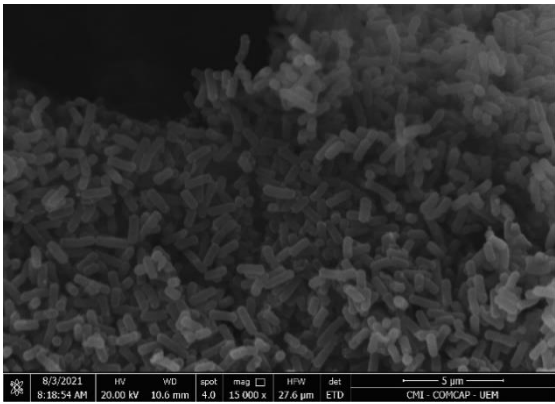


Fig 3.

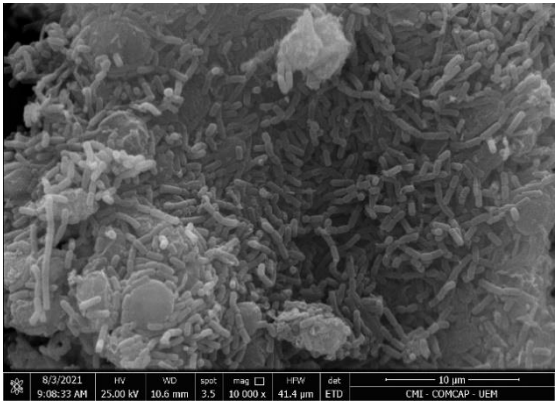
(A)



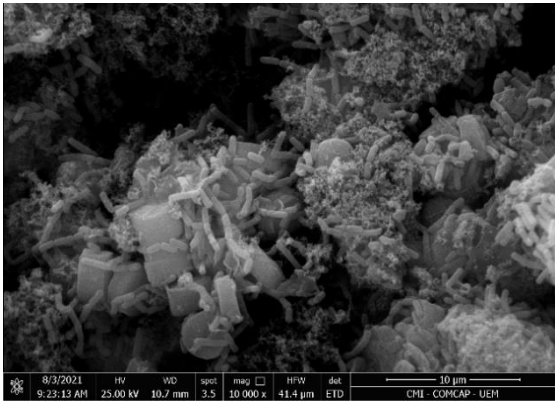
(B)



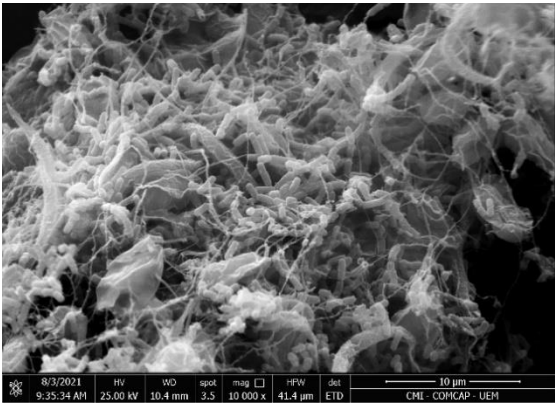
(C)



(D)



(E)



(F)

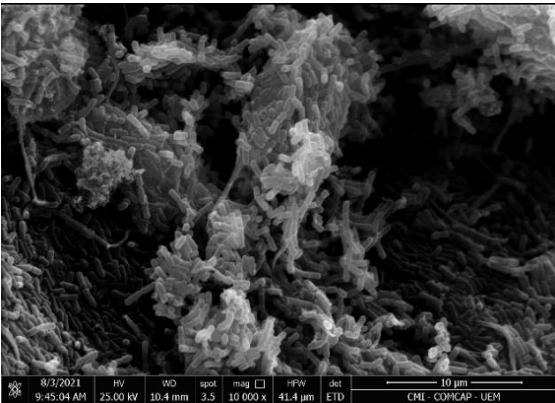


Fig. 4

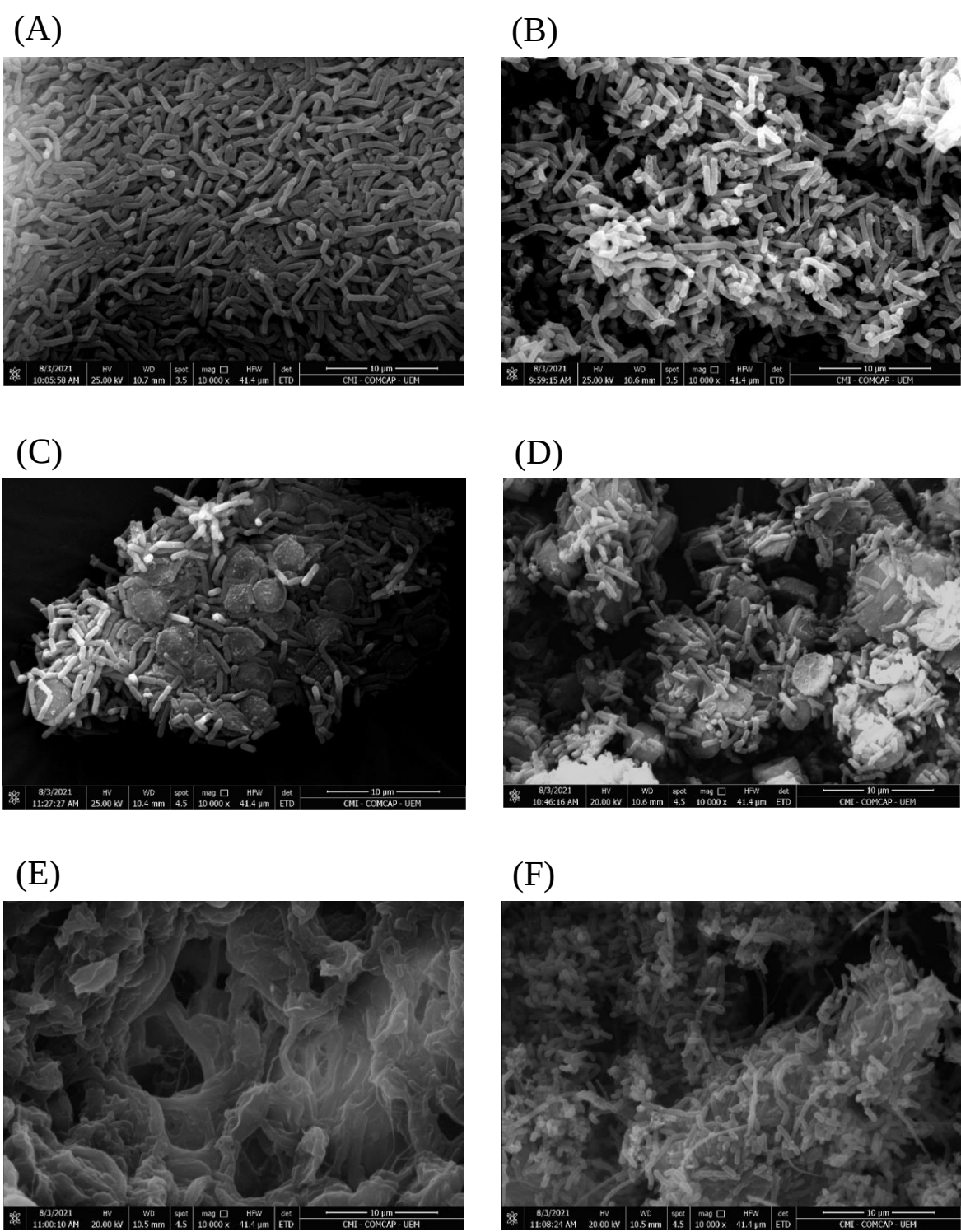


Fig. 5

Table 1. Viable cell counts of *Lactobacillus acidophilus* 05 and *Lacticaseibacillus casei* 01 after freeze-drying with fructooligosaccharides (FOS) or freshwater microalgae biomasses

Probiotic strains	Cryoprotector	Before freeze-drying (log CFU/mL)	After freeze-drying (log CFU/mL)	Viability loss (before – after freeze drying) (log CFU/mL)
<i>L. acidophilus</i> 05	Control	11.21 ± 0.09	9.18 ± 0.01	2.03 ±0.07 ^a
	Fructooligosaccharides	10.29 ± 0.01	9.28 ± 0.10	1.01 ±0.09 ^b
	<i>Chlorella vulgaris</i>	10.43 ± 0.07	9.23 ± 0.10	1.20 ±0.04 ^b
	<i>Spirulina platensis</i>	10.26 ± 0.07	9.25 ± 0.02	1.01 ±0.05 ^b
	<i>Lagerheimia longiseta</i>	10.47 ± 0.01	9.44 ± 0.04	1.03 ±0.05 ^b
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	10.49 ±0.03	9.47 ± 0.01	1.02 ±0.01 ^b
<i>L. casei</i> 01	Control	11.12 ± 0.01	9.49 ± 0.09	1.63 ±0.08 ^a
	Fructooligosaccharides	10.10 ± 0.05	9.14 ± 0.19	0.96 ±0.10 ^b
	<i>Chlorella vulgaris</i>	10.40 ± 0.12	9.04 ± 0.01	1.36 ±0.13 ^a
	<i>Spirulina platensis</i>	10.69 ± 0.01	9.35 ± 0.06	1.34 ±0.03 ^a
	<i>Lagerheimia longiseta</i>	10.48 ± 0.02	9.60 ± 0.69	0.88 ±0.06 ^b
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	10.54 ± 0.05	9.72 ± 0.17	0.82 ±0.01 ^b

Control: Saline solution; ^{a-b} Different superscript lowercase letters in the same row denotes difference (p < 0.05) among the counts loss of cells during freeze-drying, based on the Tukey’s test.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apresenta resultados inéditos sobre o potencial de microalgas dulcícolas na proteção de culturas probióticas. Todas as biomassas de microalgas (SP, CV, SQ e LL) liofilizadas com La-5 e Lc-1 forneceram proteção semelhante ou superior ao FOS (um reconhecido crioprotetor) durante liofilização, armazenamento refrigerado e digestão gastrointestinal *in vitro*, no entanto, os resultados foram específicos para cada cepa probiótica e espécie de microalga.

As culturas probióticas liofilizadas com as biomassas de microalgas obtiveram contagens superiores a 6,15 log UFC/g após armazenamento de 120 dias e digestão gastrointestinal *in vitro*. A utilização de SP, CV, LL resultou em menor dano à membrana para ambas as culturas probióticas. O efeito protetor das biomassas de microalgas pode estar associado à adesão de probióticos as microalgas e à produção de EPS. As melhores viabilidades probióticas foram estabelecidas para Lc-1 liofilizada com CV e La-5 liofilizada com SP.

Os resultados apresentados são essenciais para ampliar o conhecimento da biomassa de microalgas dulcícolas com potencial de aplicação como protetores de culturas probióticas, contribuindo na sobrevivência probiótica durante armazenamento e digestão gastrointestinal *in vitro*. Além disto, este estudo revela espécies de microalgas não tóxicas e pouco exploradas comercialmente, como SQ e LL. Sugere-se pesquisas futuras avaliando os efeitos dos probióticos liofilizados com biomassas de microalgas em matrizes alimentares não-lácteas, como forma de viabilizar incorporação e consumo de culturas probióticas em novos produtos destinados a consumidores intolerantes à lactose, alérgicas às proteínas do leite ou veganas.