

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



Dissertação

***Lactobacillus* sp. H7 isolado de kefir na produção e caracterização de leite fermentado com a adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta**

Paola Valente Rodrigues
Bacharela em Química de Alimentos

Pelotas, 2022

Paola Valente Rodrigues

***Lactobacillus* sp. H7 isolado de kefir na produção e caracterização de leite fermentado com a adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini

Dr. Cláudio Eduardo Dos Santos Cruxen

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R696l Rodrigues, Paola Valente

Lactobacillus sp. H7 isolado de kefir na produção e caracterização de leite fermentado com a adição de Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bb-12 e amora-preta / Paola Valente Rodrigues ; Ângela Maria Fiorentini, orientadora ; Cláudio Eduardo Dos Santos Cruxen, Wladimir Padilha da Silva, coorientadores. — Pelotas, 2022.

91 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Liofilização. 2. Produtos lácteos. 3. Probióticos. 4. Tolerância ao trato gastrointestinal. 5. Bactérias ácido-láticas. I. Fiorentini, Ângela Maria, orient. II. Cruxen, Cláudio Eduardo Dos Santos, coorient. III. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Paola Valente Rodrigues

***Lactobacillus* sp. H7 isolado de kefir na produção e caracterização de leite fermentado com a adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta**

Dissertação, como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 13/05/2022

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini – Presidente

Doutora em Ciências dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC

Dra. Giovana Paula Zandoná – Membro titular

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Pelotas/UFPel

Profa. Dra. Graciela Völz Lopes – Membro titular

Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS

Profa. Dra. Maristela Cortez Sawitzki – Membro titular

Doutora em Ciências dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC

Dedico este trabalho aos meus pais, meu irmão e
minha família.

Agradecimentos

Agradeço ao apoio da minha família pela força e carinho, em especial a minha mãe, sem ela ao meu lado eu não conseguiria caminhar nem trilhar estes momentos, ela é meu lar.

A toda equipe do Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal (LPOA), pela paciência e dedicação, pelas palavras, apoio e ajuda que contribuíram para a realização da pesquisa, muito obrigada.

A minha orientadora prof^a. Dra. Ângela Maria Fiorentini pela oportunidade e paciência, pelas conversas de apoio e força para o desenvolvimento do trabalho.

Aos co-orientadores prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva e Dr. Cláudio Eduardo dos Santos Cruzen, por viabilizar a realização das análises microbiológicas e pelas contribuições, foram de muita valia para a elaboração da pesquisa, meu muito obrigada a vocês.

À Embrapa Pelotas pela colaboração e fornecimento das amostras de amora-preta liofilizada, em especial a Márcia Vizzoto Foster pela simpatia e a forma atenciosa que nos concedeu espaço para realização de algumas análises, muito obrigada.

Aos meus amigos, por entender meus momentos de dificuldade e me ajudarem com palavras de motivação e amor, eu amo vocês.

Ao CNPQ e o programa de Pós-graduação PPGCTA pela bolsa concedida, espero que mais pesquisas possam ser desenvolvidas e desempenhadas para que possamos crescer e progredir.

Ao meu pai, que não está mais presente, mas se faz vivo em meu coração, em todo o ensinamento e palavras que estão em minha memória.

Resumo

RODRIGUES, Paola Valente. *Lactobacillus* sp. H7 isolado de kefir na produção e caracterização de leite fermentado com a adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta. 2022. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Alimentos lácteos fermentados têm sido, cada vez mais, relacionados com a saúde e bem-estar, desta forma a adição de frutas e bactérias probióticas tornam-os mais nutritivos e atrativos ao consumidor. Assim, o estudo teve como objetivo avaliar o potencial probiótico e tecnológico de *Lactobacillus* sp. H7, isolado de kefir, na produção de leite fermentado adicionado de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta. A partir de quatro amostras de kefir obteve-se 40 isolados, utilizando o meio seletivo (ágar MRS), para bactérias ácido-láticas (BAL). Foram realizados testes de coloração de Gram e catalase, avaliação dos aspectos de segurança microbiológica incluindo testes como, atividade da enzima Dnase, atividade hemolítica, atividade da enzima gelatinase, susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico e avaliação da presença de plasmídeo. Analisou-se o potencial tecnológico e probiótico e sua identificação molecular. O isolado identificado molecularmente como *Lactobacillus* sp. H7 apresentou potencial tecnológico e probiótico demonstrando valores de auto-agregação e co-agregação, respectivamente de 67,69% e 39,33% e capacidade hidrofóbica de 12,67%. Entre os dois isolados, H7 foi selecionado para a elaboração do leite fermentado, por apresentar capacidade de sintetizar exopolissacarídeos. Elaborou-se dois tratamentos do leite fermentado, a partir da formulação básica, sendo um deles mantido na forma de gel (LF) e o outro submetido ao processo de liofilização (LFLR), ambos mantidos em refrigeração. O leite fermentado liofilizado foi sempre reconstituído, antes da realização das análises. Na avaliação da viabilidade em simulação sob trânsito gastrointestinal, o isolado H7 apresentou uma estimativa da população microbiana de 5,99 log UFC.mL⁻¹ para LF e 5,93 log UFC.mL⁻¹ para LFLR, enquanto que a bactéria probiótica Bb-12 apresentou contagem superior a 6 log UFC.mL⁻¹ para ambos. Também foi avaliada a viabilidade destas bactérias durante o tempo de armazenamento do leite fermentado em refrigeração, obtendo para o isolado *Lactobacillus* sp. H7 e a bactéria probiótica Bb-12, ao final do período de 35 dias, 7,28 log UFC.mL⁻¹ e 7,46 log UFC.mL⁻¹ para LF e 7,21 log UFC.mL⁻¹ e 6,74 log UFC.mL⁻¹ para LFLR, respectivamente. Os tratamentos não demonstraram diferença significativa quanto a pH, umidade, cinzas, lipídios, proteínas, antocianinas, compostos fenólicos e antioxidantes. O tratamento LF apresentou acidez igual ou superior ao LFLR. A adição de polpa de amora-preta contribui com as antocianinas, compostos fenólicos e antioxidantes no produto lácteo. Os dois tratamentos mostraram boa aceitação sensorial, entretanto o LF foi a amostra preferida entre os avaliadores. Assim, pode-se concluir que o isolado *Lactobacillus* sp. H7 demonstrou potencial tecnológico para a elaboração de um leite fermentado e juntamente com a Bb-12 garantiram um produto probiótico, e mantiveram uma viabilidade superior a 6 log UFC.mL⁻¹, durante os 35 dias de armazenamento, independente do processo de liofilização.

Palavras-chave: Liofilização; produtos lácteos; probióticos; tolerância ao trato gastrointestinal; bactérias ácido-láticas

Abstract

RODRIGUES, Paola Valente. *Lactobacillus* sp. H7 isolated from kefir in the production and characterization of fermented milk with the addition of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 and blackberry. 2022. 91f. Thesis (Master's degree in Food Science and Technology) - Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Fermented dairy foods have been increasingly associated with health and well-being, and the addition of fruits and probiotics bacteria make them more nutritious and appealing to the consumer. Thus, in this study the objective was to evaluate the technological potential of *Lactobacillus* sp. H7 isolated from kefir in the production of fermented milk added with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 and blackberry. From four kefir samples, 40 isolates were obtained using the selective medium (MRS agar) for lactic acid bacteria (BAL). Gram stain and catalase tests were performed, evaluation of microbiological safety aspects including tests such as Dnase enzyme activity, hemolytic activity, gelatinase enzyme activity, susceptibility to antimicrobials of clinical use and evaluation of the presence of plasmid. The technological and probiotic potential and its molecular identification were analyzed. The isolate identified molecularly as *Lactobacillus* sp. H7 showed technological and probiotic potential, demonstrating values of self-aggregation and co-aggregation, respectively of 67.69% and 39.33% and hydrophobic capacity of 12.67%. Among the two isolates, H7 was selected for the elaboration of fermented milk, due to its ability to synthesize exopolysaccharides. Two treatments of the fermented milk were elaborated, starting from the basic formulation, being one of them kept in the form of gel (LF) and the other submitted to the process of lyophilization (LFLR), both kept in refrigeration. The freeze-dried fermented milk was always reconstituted before performing the analyses. In the analysis of fermented milk, in the gastrointestinal transit simulation, the isolate H7 presented a count of 5.99 log CFU.mL⁻¹ for LF and 5.93 log CFU.mL⁻¹ for LFLR, while the probiotic bacterium Bb-12 had a count higher than 6 log CFU/mL for both. The viability of these bacteria during the storage time of the fermented milk in refrigeration was also evaluated, obtaining for the isolate *Lactobacillus* sp. H7 and the probiotic bacterium Bb-12, at the end of the 35 day period, 7.28 log CFU.mL⁻¹ and 7.46 log CFU.mL⁻¹ for LF and 7.21 log CFU.mL⁻¹ and 6.74 log CFU.mL⁻¹ for LFLR, respectively. The treatments showed no significant difference regarding the pH, humidity, ashes, lipids, proteins, anthocyanins, phenolic compounds and antioxidants. The treatments LF presented acidity higher than or equal to LFLR. The addition of blackberry pulp contributes with the anthocyanins, phenolic compounds and antioxidants in the dairy product. Both treatments showed good sensory acceptance, however the LF was the preferred sample among the evaluators. Thus, it can be concluded that the isolated *Lactobacillus* sp. H7 demonstrated technological potential for the elaboration of a fermented milk and, together with Bb-12, guaranteed a probiotic product, and maintained a viability higher than 6 log CFU.mL⁻¹, during the 35 days of storage, regardless of the lyophilization process.

KEYWORDS: Lyophilization; dairy products; probiotics; gastrointestinal tract tolerance; lactic acid bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Autoagregação ao longo do tempo em horas dos isolados F1 e H7 (IC = 3.4) e (B) co-agregação ao longo do tempo em horas dos isolados F1 e H7 (IC = 3.68).....	48
Figura 2	Monitoramento do pH(A) e acidez(B) durante o processo fermentativo do leite pelo isolado <i>Lactobacillus</i> sp.H7.....	57
Figura 3	pH (A) e acidez (B) em leites fermentados de amora-preta armazenados sob refrigeração (IC = 0.184).	60
Figura 4	Viabilidade ao longo do tempo de H7 (IC = 0.468) e (B) de Bb-12 (IC = 0.375) em leite fermentado (LF) e em leite fermentado liofilizado reconstituído(LFLR).....	64
Figura 5	Classificação dos escores hedônicos em percentual dos leites fermentados suplementados com <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 e polpa de amora-preta.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise da susceptibilidade dos isolados de kefir (H7 e F1) a antimicrobianos de uso clínico.....	43
Tabela 2	Percentual de auto-agregação e co-agregação em comparação com os isolados <i>Lactobacillus</i> sp. H7 e <i>Enterococcus thailandicus</i> F1 procedentes de kefir.....	46
Tabela 3	Valores dos halos formados pela atividade antimicrobiana dos isolados <i>Lactobacillus</i> sp. H7 e <i>Enterococcus thailandicus</i> F1.....	51
Tabela 4	Caracterização físico-química da polpa de amora-preta liofilizada.....	55
Tabela 5	Resultados preditos de pH e acidez, a cada hora, a partir do tempo de 6h de fermentação do leite.....	57
Tabela 6	Acidez nas diferentes formulações de leite fermentado suplementado com <i>Bifidobacterium lactis</i> e amora-preta ao longo do armazenamento refrigerado.....	59
Tabela 7	Viabilidade de <i>Lactobacillus</i> sp. H7 e <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 (log CFU g ⁻¹) em leite fermentado e leite fermentado liofilizado reconstituído durante passagem no TGI.....	61
Tabela 8	Viabilidade de <i>Lactobacillus</i> sp. H7 e <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 em leite fermentado e leite fermentado liofilizado reconstituído durante armazenamento em refrigeração.....	63
Tabela 9	Análises físico-químicas e fitoquímicas em leite fermentado e leite fermentado liofilizado reconstituído, suplementado com <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 e polpa de amora-preta.....	66

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo Geral.....	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. Revisão da Literatura	16
3.1. Bactérias ácido-láticas.....	16
3.2. Probióticos.....	18
3.3. Kefir.....	21
3.4. Leite Fermentado.....	23
3.5. Amora-preta (<i>Rubus</i> sp.).....	24
3.6. Liofilização de produtos lácteos.....	26
4. Capítulo 1- <i>Lactobacillus</i> sp. H7 isolado de kefir na produção e caracterização de leite fermentado com a adição de <i>Bifidobacterium</i> <i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 e amora-preta.....	28
4.1. Introdução.....	28
4.2. Material e métodos.....	30
4.3. Resultados e discussão.....	41
4.4. Conclusão.....	67
Considerações finais.....	69
Referências	70
Apêndices.....	87

1. Introdução

Os alimentos são importantes fontes de nutrientes para os consumidores. No entanto, muitos alimentos além de fornecerem a fonte de nutrição necessária, dispõem em sua composição substâncias promotoras de bem-estar e saúde aos seres humanos (BANWO *et al.*, 2021).

Alimentos contendo microrganismos probióticos destacam-se por sua capacidade de oferecer benefícios à saúde. Esses microrganismos, de acordo com requisitos previstos na legislação, são capazes de promover a estimulação do sistema imune pelo aumento dos níveis de anticorpos, competir com bactérias patogênicas pela colonização do trato gastrointestinal, provocando a multiplicação de bactérias benéficas que auxiliam na digestão e no equilíbrio da microbiota intestinal (REQUE; BRANDELLI, 2021).

Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas promovem ação benéfica à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014). Contudo, para um microrganismo ser considerado probiótico, este deve atender uma série de requisitos, sendo um deles, a permanência viável da bactéria, após a passagem pelo trato gastrointestinal, em uma população estimada de $6 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$, bem como possuir a capacidade de auto-agregação, co-agregação, atividade antagonista contra patógenos, dentre outros (SIDIRA *et al.*, 2015).

A ação no hospedeiro pelos microrganismos probióticos, resulta de diversos processos, que podem agir em associação ou independentes no produto, ou seja com a adição de componentes que possam auxiliar nos efeitos benéficos, sendo assim, um desafio preservar a viabilidade das espécies de microrganismos desejáveis na microbiota intestinal, pois o trato gastrointestinal humano, caracteriza-se como um ambiente competitivo (BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012).

No grupo das bactérias ácido-láticas (BAL), muitas espécies apresentam propriedades probióticas, e possuem a vantagem, de uma grande maioria, serem seguras para o consumo humano, ou seja, são consideradas GRAS (*Generally Recognized as Safe*), não causando enfermidades aos consumidores (CASTELLANO *et al.*, 2008), e se mostram importantes tecnologicamente, na produção de alimentos como culturas iniciadoras ou culturas adjuntas. Para um

microrganismo ser selecionado como seguro e probiótico, este passa por uma série de requisitos, incluindo métodos de avaliação de segurança relativos a virulência, toxicidade e resistência a antibióticos (PEREIRA *et al.*, 2018).

Espécies de *Bifidobacterium* por serem anaeróbias, são afetadas pela presença de oxigênio. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* se destaca por ser usada em produtos lácteos em consequência da sua boa tolerância a pH ácido (YERLIKAYA; SAYGILI; AKPINAR, 2021).

As BAL podem estar presentes na microbiota nativa de alguns alimentos, principalmente, os derivados lácteos artesanais e leite *in natura* (RIBEIRO, 2015). Um derivado lácteo, denominado kefir, é um produto adequado para prospectar novos isolados, devido a diversidade microbiana que apresentam (BAL, bactérias acéticas e leveduras), e esta microbiota, está relacionada com a origem/procedência dos grãos, condições de cultivo, acondicionamento e processamento de fabricação (GUT *et al.*, 2019).

Desse modo, podemos observar que as BAL, em especial da família *Lactobacillaceae*, apresentam bom potencial tecnológico para a produção de alimentos, devido a aptidão destas, de provocar transformações na matéria-prima, contribuindo para o sabor e textura de produtos fermentados (IKEDA, 2013), em consequência da produção de ácidos orgânicos, compostos aromáticos, exopolissacarídeos, bem como fazem a biopreservação de alimentos por ação de bacteriocinas (SALVUCCI; LE BLANC; PÉREZ, 2016). Algumas cepas de BAL quando em condições propícias para o seu desenvolvimento também podem produzir vitaminas do Complexo B, como vitamina B9 (folato) (LAIÑO *et al.*, 2015). Um dos principais produtos comercializados com microrganismos probióticos são os leites fermentados, os quais são produzidos a partir da fermentação por bactérias ácido-láticas capazes de utilizar os substratos presentes no leite resultando na produção de ácidos e consequente redução do pH (LUZ *et al.*, 2021).

Em vista da obtenção de novos produtos, o kefir, uma bebida composta por bactérias ácido-láticas, bactérias acéticas e leveduras, demonstra ser uma matriz de interesse para o isolamento de novas culturas, pois estes microrganismos encontram-se dispostos em um ecossistema em simbiose, através de uma matriz de exopolissacarídeos (GONZÁLEZ-OROZCO *et al.*, 2022).

Para a promoção da saúde além dos probióticos, compostos biologicamente ativos presentes nas frutas, também são importantes. A amora-preta, é uma fruta que possui várias propriedades, dentre elas a alta concentração de compostos fenólicos, que se destacam pela sua alta atividade antioxidante nos frutos. Estes fatores aliados aos mecanismos de ação de cepas probióticas auxiliam na obtenção de um produto de boa qualidade e saudabilidade (DA SILVA *et al.*, 2019). Ainda, o efeito da polpa de frutas sobre os probióticos tem sido estudado em várias pesquisas recentes, trazendo a interação destes em leites fermentados e avaliando sua eficácia na saúde do consumidor (MANTZOURANI *et al.*, 2020).

Para garantir a sobrevivência e viabilidade dos microrganismos no produto, a aplicação do método de liofilização pode trazer um melhor desempenho dos microrganismos durante o armazenamento no produto. A liofilização é um processo que utiliza baixa temperatura e pressão durante a operação, contribuindo assim na retenção da estrutura nativa, propriedades bioquímicas e atividades de células bacterianas (OLUWATOYIN; TAI; FAGAN-ENDRES, 2022).

No presente estudo, objetivou-se avaliar o potencial probiótico e tecnológico de *Lactobacillus* sp. H7 isolado de kefir, na produção de leite fermentado suplementado de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta, submetido ao processo de liofilização.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial probiótico e tecnológico de *Lactobacillus* sp. H7 isolado de kefir, na produção de leite fermentado com suplementação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e polpa de amora-preta.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Isolar, identificar e caracterizar bactérias ácido-láticas (BAL), procedentes de kefir;
- ✓ Avaliar os parâmetros de segurança microbiológica e o potencial tecnológico e probiótico dos isolados, *in vitro*;
- ✓ Avaliar o potencial fermentativo do isolado de BAL selecionado, na produção de leite fermentado;
- ✓ Avaliar a viabilidade do isolado de BAL potencialmente probiótico selecionado e da cultura probiótica no leite fermentado durante o trânsito gastrointestinal e no período de armazenamento;
- ✓ Avaliar a influência do processo de liofilização e reconstituição nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do leite fermentado probiótico liofilizado suplementado com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e polpa de amora-preta.

3. Revisão da Literatura

3.1. Bactérias ácido-láticas

As bactérias ácido-láticas (BAL), são muito utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação de uma diversidade de alimentos, auxiliando na conservação e no valor nutricional e sensorial dos produtos gerados. Em virtude das características metabólicas e fisiológicas são capazes de fermentar carboidratos resultando na produção de compostos como os ácidos orgânicos, que provocam a redução do pH do substrato (LEVIT *et al.*, 2020), peptídeos antimicrobianos, diacetil, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e dióxido carbônico (CO₂) (BACHTARZI; KHARROUB; RUAS-MADIEDO, 2019).

As BAL abrangem um grupo de microrganismos que apresentam morfologia na forma de cocos ou bacilos, Gram-positiva, catalase negativa, não produzem esporos são anaeróbios facultativos, produzindo ácido lático como produto final da fermentação de carboidratos (LEVIT *et al.*, 2020).

As BAL adquirem energia por meio da fermentação de açúcares e possuem duas vias principais de fermentação, a homofermentativa e a heterofermentativa. A homofermentação é caracterizada pela formação de ácido lático como o principal produto do metabolismo da glicose através da via glicolítica ou via de Embden-Meyerhoff). Enquanto na heterofermentação, há produção de quantidades iguais de ácido lático, dióxido de carbono, etanol ou acetato produzidos a partir da glicose pela via oxidativa das pentoses fosfato (PPP) (WANG *et al.*, 2020).

As BAL são reconhecidas pela FDA (Food and Drug Administration) como GRAS (Generally Recognized as Safe), possibilitando a sua utilização como cultura iniciadora na fermentação de diversos produtos alimentícios, devido estas não apresentarem risco ao consumidor (MOJGANI *et al.*, 2015), bem como, possuem a capacidade de atuar na bioconservação, pela produção de substâncias antimicrobianas, resultantes do seu metabolismo como o ácido lático e bacteriocinas (FIELD; ROSS; HILL, 2018), podendo ser uma opção aos aditivos alimentares, devido a produção de compostos que auxiliam a evitar a proliferação de microrganismos deteriorantes e patogênicos (MOHAMMED; ÇON, 2021).

Algumas BAL também apresentam a capacidade de produzir folato (vitamina B9) e outras vitaminas do complexo B, sendo esta produção atribuída a expressão

de alguns genes do microrganismo (LEBLANC *et al.*, 2015; ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). Outras propriedades relacionadas as BAL é a produção de certas enzimas como a β -galactosidase que pode hidrolisar a lactose; α -glicosidase que quebra amidos e dissacarídeos em glicose e outros produtos; hidrolase de sais biliares (BSH) capaz de reduzir os níveis séricos de colesterol e glutamato descarboxilase que converte o glutamato em ácido γ -aminobutírico (GABA) (QUÍLEZ; DIANA, 2017).

Os principais gêneros pertencentes ao grupo de BAL são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, entre outros (HOLZAPFEL, *et al.*, 2001; ALBAYRAK; DURAN, 2021), e podem ser encontradas em ambientes ricos em nutrientes, principalmente, carboidratos e proteínas (LEVIT, *et al.*, 2020), como os produtos lácteos e seus derivados, onde estas se encontram naturalmente ou através da aplicação destas em processos fermentativos (BACHTARZI; KHARROUB; RUAS-MADIEDO, 2019). Espécies da família Lactobacillaceae são consideradas mais importante, no que se refere a aplicação em alimentos. As espécies fermentam carboidratos e tem capacidade específica da cepa em fermentar frutanos extracelulares, amido e glicogênio (ZHENG *et al.*, 2020).

Cepas de BAL são comumente utilizadas na produção de alimentos devido a sua eficácia na elaboração de produtos lácteos fermentados. Em estudo realizado por Rodríguez-Sánchez *et al.* (2021) avaliaram o comportamento de cepas de *Lactobacillus* e a utilização destas em alimentos lácteos fermentados com intuito de promover ação benéfica. Ao total, noventa e oito cepas de *Lactobacillus* foram avaliadas quanto as características de segurança, tecnológicos e propriedades promotoras de saúde, destas apenas treze cepas atingiram resultados satisfatórios para serem selecionadas para uso em novos produtos.

Aspectos de segurança e tecnológicos são importantes para a escolha de cepas para uso em novos produtos, pois estes avaliam os efeitos que os microrganismos podem acometer e suas características frente a fatores intrínsecos e extrínsecos como, pH e temperatura, respectivamente. Dentre os testes para avaliação dos parâmetros de segurança microbiológica, destacam-se atividade da enzima Dnase com o intuito de verificar a presença da enzima Dnase a qual degrada o ácido nucléico, atividade hemolítica que verifica se os microrganismos produzem hemolisina, com capacidade de lisar hemácias, atividade da enzima gelatinase com finalidade de verificar a produção da gelatinase, capaz de hidrolisar o colágeno e

alguns peptídeos e susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico com o objetivo de testar os isolados com diferentes antimicrobianos e analisar se estes são sensíveis ou resistentes (FUNCK *et al.*, 2019).

Çisem e Mustafa (2021) realizaram o isolamento de bactérias ácido-láticas de queijos brancos tradicionalmente produzidas com leite de vaca e/ou ovelha. Foram obtidos 40 isolados caracterizados como *Enterococcus* spp. por testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, estes foram analisados quanto o potencial probiótico e capacidade de produção de aroma pela obtenção de diacetil. O isolamento e caracterização de bactérias ácido-láticas demonstram fornecer informações importantes quanto aos microrganismos e a possível utilização destes em produtos alimentícios.

Em relação aos benefícios do consumo de alimentos contendo BAL, vários estudos têm relatado que algumas cepas de BAL, são denominadas probióticas, pois dispõem de funções promotoras de saúde como resistência a patógenos, prevenção da intolerância a lactose, efeitos anticarcinogênicos, reversão dos sintomas de depressão e ansiedade, entre outros (LEVIT *et al.*, 2020).

3.2. Probióticos

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014).

Dentre os benefícios concedidos tem-se: colonização do trato gastrointestinal, redução dos níveis de colesterol, aumento dos níveis de anticorpos, barreira contra adesão de bactérias patogênicas aos tecidos epiteliais do intestino, redução dos sintomas de intolerância a lactose, entre outros (ILAVENIL *et al.*, 2016). Estes benefícios, estão associados a um ou mais mecanismos, como modulação da microbiota intestinal, modulação da resposta imune e competição por nutrientes (VERA-PINGITORE *et al.*, 2016).

Um microrganismo considerado probiótico, deve ser seguro e caracterizado funcionalmente por estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo uma das etapas a persistência e viabilidade no trato gastrointestinal, que se inicia com a sobrevivência a ação do pH e das enzimas salivares, devendo suportar as condições ácidas do estômago, os sais biliares e enzimas pancreáticas no intestino e, ainda, multiplicar e aderir-se às

células da mucosa intestinal no hospedeiro (COOK *et al.*, 2012; MARTÍN *et al.*, 2015), e nesta etapa final do processo na região intestinal, deve estar em concentrações $\geq 6 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ (HILL *et al.*, 2014).

Os microrganismos mais utilizados e selecionados com propriedades probióticas são as espécies de BAL da família Lactobacillaceae (*L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei var. defensis*, *L. casei var. rhamnosus*, *L. paracasei* e *L. lactis*) e espécies não lácticas do gênero *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium longun*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium animalis*, sendo que a espécie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* é considerada a mais utilizada em produtos lácteos por conta de sua boa tolerância aos fatores ambientais gerados nos produtos pelas bactérias como ácidos que conseqüentemente reduzem o pH (SURENDRAN *et al.*, 2017; AKPINAR; SAYGILI; YERLIKAYA, 2020; YERLIKAYA; SAYGILI; AKPINAR, 2021).

Dentre os probióticos usados com maior frequência em alimentos, destacam-se *Lactobacillus* spp. (BAL) e *Bifidobacterium* spp., sendo ambos amplamente explorados em estudos experimentais (SURENDRAN *et al.*, 2017).

As espécies do gênero *Bifidobacterium* se classificam como anaeróbicas e portanto, o crescimento e a viabilidade são influenciados negativamente, pela presença de oxigênio (YERLIKAYA; SAYGILI; AKPINAR, 2021). Estas são classificadas e utilizadas como probióticas em alimentos em função, da alta capacidade de sobrevivência durante a passagem ao trato gastrointestinal e sua adesão a mucosa intestinal. Demonstram ter efeitos favoráveis na fisiologia e metabolismo do hospedeiro, produzem metabólitos na forma de ácido propionico e ácidos graxos de cadeia curta capazes de clivar ligações galactosídicas e possuem características tecnológicas em virtude da sua sobrevivência em armazenamento (SOFYAN *et al.*, 2022).

A prevalência de microrganismos probióticos no trato gastrointestinal do hospedeiro, restaura o equilíbrio da microbiota, pois pode inibir as bactérias patogênicas, através de exclusão competitiva pela competição por nutrientes, espaço e sítios de adesão às células do epitélio intestinal, inibindo a ação de toxinas pela produção de substâncias antimicrobianas (FONTANA *et al.*, 2013). A interação com a membrana intestinal e a adesão às células do epitélio impedem a aderência de microrganismos patogênicos (FONTANA *et al.*, 2013).

Também se pressupõe que algumas bactérias probióticas, podem estar relacionadas com a redução dos níveis de colesterol devido a degradação dos sais biliares (DE MELO PEREIRA *et al.*, 2018). Estas também estão relacionadas a degradação da lactose no intestino, devido a produção da enzima β -galactosidase, popularmente conhecida como lactase, que proporciona redução no desconforto abdominal associados a diarreias osmóticas, em indivíduos que apresentam deficiência na quantidade de β -galactosidase (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

Com base no consumo de microrganismos viáveis, que conferem benefícios ao consumidor, é recomendado a ingestão de alimentos probióticos que contenham no mínimo de 6 log UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹ do produto (HILL *et al.*, 2014; PAPADOPOULOU *et al.*, 2018). Nesse sentido, é importante a viabilidade dos probióticos no produto, estes deverão apresentar habilidades para sobreviver às condições de processo, aos fatores intrínsecos do alimento e ao armazenamento do produto (PAPADOPOULOU *et al.*, 2018).

Os produtos lácteos são considerados bons veículos para microrganismos probióticos (MORIANO; ALAMPRESE, 2017), uma vez que se encontram bem adaptados às características dessa matriz alimentícia. O leite cru, os queijos e kefir artesanais apresentam uma microbiota autóctone e complexa formada por vários grupos de microrganismos incluindo as BAL, as quais colaboram na biopreservação e nas características sensoriais dos produtos (PISANO *et al.*, 2014).

Funck *et al.* (2019) avaliaram o potencial probiótico de *Lactobacillus curvatus* P99 e a viabilidade em bebida láctea fermentada de aveia durante o armazenamento por 35 dias a 4 °C. O estudo comprovou a capacidade de sobrevivência da bactéria durante a passagem no trato gastrointestinal e demonstrou hidrofobicidade, auto-agregação e co-agregação com *Listeria monocytogenes*. O isolado mostrou-se eficiente em todos os aspectos mostrando-se ser uma ótima cultura para ser utilizada na elaboração de alimentos lácteos fermentados.

Vitola *et al.* (2018) isolaram *L. casei* de silagem de colostro bovino e utilizaram o método de imobilização com a soja como suporte, a fim de manter a viabilidade dos microrganismos nos alimentos durante o armazenamento até seu consumo. As contagens de células viáveis de *L. casei* CSL3 foram de 6,23 log UFC.g⁻¹ e 6,71 log UFC.g⁻¹ por 30 dias de armazenamento após liofilização e sob armazenamento refrigerado, respectivamente. Os isolados CSL3 e CSL16 apresentaram

concentrações superiores a $6,5 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ durante a passagem pelo trato gastrointestinal em todos os tempos e tratamentos, em especial o isolado CSL3 que não apresentou diferença significativa entre os tempos e condições durante a passagem, mantendo-se viável em concentrações maiores que $7,3 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ podendo-se dizer que este isolado apresenta potencial probiótico.

Nos dias atuais, percebemos, que os consumidores buscam alimentos que causem efeito benéfico, aliado a isso observa-se a importância de isolar e selecionar bactérias ácido-láticas com potencial probiótico aumentando a diversidade de produtos no mercado e proporcionando alimentos de boa qualidade e com benefícios a saúde, evitando a incidência de doenças e auxiliando no equilíbrio da microbiota intestinal do ser humano.

3.3. Kefir

A bebida kefir possui legislação específica, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. No regulamento consta que este, é um leite fermentado adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, na qual a fermentação se realiza pela ação de leveduras, bactérias ácido-láticas organizadas em grãos de kefir, como *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido lático, etanol e dióxido de carbono (BRASIL, 2007).

No decorrer do processamento, ocorre uma dupla fermentação do leite por bactérias e leveduras, resultando na produção de um alimento rico em ácido lático e acético, álcool etílico, vitamina B12, exopolissacarídeos, entre outras características que proporcionam benefícios à saúde (WESCHENFELDER *et al.*, 2011)

Em estudo realizado por Weschenfelder *et al.*, (2011) classificaram-se o alimento como muito ácido, devido o reduzido pH deste produto, garantindo a inibição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes tornando o kefir um alimento seguro para consumo.

Segundo Diniz *et al.* (2003) a bebida kefir promove propriedades funcionais a quem consome, como a redução dos efeitos de intolerância a lactose, a modulação do sistema imune, a proteção frente aos microrganismos patogênicos, o balanço da microbiota intestinal e a reorganização hepática.

As quantidades de proteína, gordura e minerais do kefir, estão relacionadas a matéria-prima utilizada para obtenção deste, possuindo assim, um valor nutricional específico ao mesmo. A bebida é palatável e tem alta digestibilidade, decorrente do processo de fermentação no qual ocorre a desnaturação das proteínas do leite e hidrólise de algumas, resultando em peptídeos e/ou aminoácidos livres, susceptíveis a digestão pelos sucos gástricos e intestinal (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008).

Guzel-Seydim, Gokirmakli e Greene (2021), relataram que alterações no perfil de aminoácidos são resultantes do crescimento de microrganismos que ocorre durante a fermentação do leite, assim observaram que o perfil de aminoácidos presentes no kefir apresentou uma quantidade maior de treonina, serina, alanina, lisina e amônia do que no leite ou iogurte. Alguns dos microrganismos contidos na bebida, possuem a capacidade de auxiliar na digestão da lactose através da atividade da enzima β -galactosidase.

Os microrganismos presentes nos grãos de kefir, a origem dos mesmos, os atributos químicos do leite empregado e as condições de estocagem, influenciam as características físicas, químicas e microbiológicas da bebida (DINIZ *et al.*, 2003).

Por ser um produto obtido, na sua grande maioria, de forma artesanal, o kefir se apresenta como uma importante matriz alimentícia para prospectar bactérias ácido-láticas, com possíveis características/propriedades diferenciadas.

Em estudo realizado por Oktay (2019) observou-se o potencial probiótico de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolada de leite cru e grãos de kefir e constatou-se melhores atividades antimicrobianas das cepas isoladas de kefir do que as do leite cru, mas em compensação estas não foram capazes de crescer em sais biliares e apresentar todas as propriedades necessárias para serem consideradas probióticas.

Jeong *et al.* (2017) isolaram cepas de BAL de kefir e avaliaram o comportamento e o potencial benéfico destes microrganismos à saúde do hospedeiro. Assim, o estudo demonstrou que todas as cepas eram produtoras de exopolissacarídeos, *Lactobacillus kefiranoferiens* DN1, foi a maior produtora. A atividade antimicrobiana através da ação do exopolissacarídeo sobressaiu-se constatando que esta foi capaz de exercer efeitos antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp..

Bengoa *et al.* (2018) avaliaram o potencial tecnológico de cepas de *Lactobacillus paracasei* isoladas de kefir e a produção de EPS por estas em

diferentes temperaturas. A produção de exopolissacarídeo pelas bactérias ácido-láticas mostra ser um fator importante a ser considerado para a utilização destas em alimentos lácteos fermentados, pois este tem como propriedade aumentar a textura dos alimentos, afetando assim no aspecto do produto. Alimentos lácteos fermentados tem como característica a textura mais acentuada, assim bactérias ácido-láticas capazes de produzir exopolissacarídeo tem melhor desempenho no desenvolvimento de um novo produto.

Ker-sin, Wang e Chen (2020), avaliaram a viabilidade de bactérias isoladas de kefir e seu comportamento durante a fermentação. Foi utilizado cana-de-açúcar para imobilização das bactérias com o intuito de aumentar a viabilidade dos microrganismos durante o armazenamento. Os pedaços de cana-de-açúcar responderam a todos os critérios físico-químicos, microbiológicos e em relação a sua textura, demonstrando que o sistema ofereceu potencial para desenvolvimento e elaboração de um leite fermentado probiótico e de eficácia para a saúde do consumidor.

O estudo de isolados utilizando o kefir, tem aumentado devido este ser discutido em várias pesquisas como um produto que oferece benefícios a saúde, por apresentar em sua composição uma diversidade de microrganismos que manifestam em seu comportamento serem capazes de produzir compostos durante a fermentação, que auxiliam no bem-estar e na saúde do ser humano (BENGOA *et al.*, 2018).

3.4. Leite Fermentado

Os alimentos fermentados constituem uma gama de produtos nutritivos, uma vez que os principais constituintes estão parcialmente digeridos, em consequência do processo fermentativo (DE OLIVEIRA; DA SILVA, 2011).

Com a fermentação de carboidratos do leite, os microrganismos responsáveis ocasionam a acidificação e o desenvolvimento de características como sabor e aroma característico de produtos lácteos (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

A legislação específica determina que: leites fermentados são produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por uma ou várias culturas: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. *Streptococcus thermophilus* e/ou outras bactérias ácido-láticas, que por sua

atividade contribuem para as características do produto final. Além disso, estes micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto durante o período de vida útil (BRASIL, 2007).

As bactérias ácido-láticas, são as mais utilizadas na produção de leites fermentados, isso deve-se ao seu bom desempenho no leite, por esta matriz alimentícia conter açúcares fermentáveis, proteínas e, por serem bem tamponados por proteínas e fosfatos, durante o processo de fermentação enriquecendo as características de laticínios (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Em estudo realizado por Casarotti *et al.* (2020) utilizou-se o maracujá como subproduto para suplementação em leite fermentado. A utilização de frutas neste tipo de produto tem sido uma maneira de aumentar os efeitos benéficos destes produtos na saúde do consumidor, elevando o poder nutritivo dos alimentos lácteos.

Assim, a utilização de polpas de frutas em produtos lácteos é uma alternativa para aumentar a diversidade destes produtos na parteleira dos mercados, trazendo diversas opções para os consumidores, além de fornecer benefícios á saúde. Bactérias probióticas também tem sido uma procura pelos consumidores, devido as suas propriedades e efeitos no organismo, aliado ao uso de polpas na elaboração de alimentos lácteos, estas elevam as propriedades nutricionais dos produtos.

3.5. Amora-preta (*Rubus sp.*)

O cultivo da amora-preta é significativo no Rio Grande do Sul, sendo este classificado como maior produtor nacional de amoreira-preta, devido a isso, estudos com essa fruta se tornam de grande importância, pois a amora-preta possui vários compostos químicos de valor significativo para a saúde do ser humano. Dentre estes, o ácido elágico, que tem função antimutagênico e anticarcinogênico (EMBRAPA, 2004). São atribuídas às frutas de amoreira-preta propriedades como, no controle de hemorragias em animais e seres humanos, controle da pressão arterial e efeito sedativo, função antioxidante, entre outras (BRAGA *et al.*, 2019).

A amora-preta é uma fruta com elevado teor de polifenóis, moléculas estas, que contêm vários anéis de fenóis, tendo como base pelo menos, um anel aromático em sua estrutura ligado a um ou mais grupamentos hidroxila (-OH). O principal flavonóide encontrado na amora-preta são as antocianinas, essas moléculas se originam a partir da adição de um glicosídeo ou de grupamentos acetil, cumaril e

cafeoil à molécula de antocianidina, conferindo maior estabilidade. No organismo, as antocianinas atuam como antioxidantes pela capacidade de doar elétron ou átomo de hidrogênio a radicais livres reativos (DA SILVA *et al.*, 2019).

Devido ao seu alto conteúdo antioxidante, a amora-preta é capaz de modular a atividade de enzimas como a superóxido dismutase e glutathione peroxidase, e diminuir a peroxidação lipídica. Estudos demonstram que o consumo de extrato de amora-preta foi capaz de reduzir o risco de doenças cardiovasculares, devido a sua capacidade de baixar os níveis séricos de triglicérides e fração LDL-colesterol, bem como impedir a peroxidação lipídica, aterogênese e agregação plaquetária (BRAGA *et al.*, 2019).

Os frutos do gênero *Rubus*, possuem um sabor mais acentuado para ácido, favorecendo seu consumo nas formas processadas ou em adição em produtos lácteos como iogurtes (SILVA *et al.*, 2019)

Os frutos de amora-preta podem ser consumidos tanto *in natura*, como aplicados ao processamento na indústria de produtos lácteos e polpas congeladas (ANTUNES, 2002). É uma frutífera que vem causando grande interesse de consumidores e produtores, principalmente, por suas propriedades benéficas à saúde (HIRSCH, 2011), bem como por apresentar baixo custo de produção e facilidade de manejo (ANTUNES, 2002; HIRSCH, 2011).

Tang *et al.* (2022) realizaram a avaliação da biotransformação de frutas cítricas em leites fermentados e o efeito protetor destas contra atividade antioxidante induzida por lipopolissacarídeos (LPS) em células Caco-2 comprovando o efeito do uso de frutas em produtos lácteos.

Segundo Borgonovi, Casarotti e Penna (2021), a aplicação de polpa de frutas no leite fermentado pode acarretar efeitos desejáveis ou indesejáveis dependendo da escolha da fruta, cepa e da quantidade de polpa de fruta a ser acrescentada no produto. Os efeitos desejáveis ou indesejáveis dos frutos na população microbiana dependem principalmente da cepa, do fruto e da concentração de bioativos, em suma os polifenóis encontrados nas frutas (RAMOS *et al.*, 2020).

Estudos têm sido efetivados para esclarecer a simbiose de frutas e microrganismos. A adição de frutas em produtos lácteos auxilia no aumento do valor nutricional, devido estas apresentarem grandes quantidades de minerais, vitaminas

e compostos bioativos contribuindo beneficemente na saúde e bem-estar do consumidor (TURGUT; CAKMAKCI, 2018).

Considerando o efeito desejável entre frutas e cepas probióticas já ressaltados em outros estudos, a aplicação de polpas de frutas ao leite fermentado probiótico apresentam melhorar a viabilidade dos probióticos ao longo do armazenamento (BARAT; OZCAN, 2018). Os prebióticos presentes em alguns alimentos como frutas e cereais, também atuam sob o crescimento e atividade metabólica de cepas probióticas. Estes são definidos como substratos usados de forma seletiva pelos microrganismos hospedeiros (REZENDE *et al.*, 2022).

A adição de polpas em alimentos lácteos é uma opção para melhorar os benefícios fornecidos por estes alimentos, além de ampliar a diversidade de produtos lácteos fermentados com potenciais benefícios à saúde do consumidor (BRAGA *et al.*, 2019).

3.6. Liofilização de produtos lácteos

A liofilização é uma das técnicas utilizadas para conservação dos alimentos, e tem como princípio a sublimação reduzindo a temperatura abaixo do ponto triplo da água, ocorrendo queda de pressão e o aumento da temperatura para o valor ambiente, fazendo com que parte da água evapore, sem passar pelo estado líquido (FELLOEWS, 2000).

Apesar de ser uma técnica de alto custo, ela apresenta grandes vantagens na indústria de alimentos, onde a preservação dos alimentos é de extrema importância para a obtenção de produtos com características semelhantes aquelas do produto não liofilizado. Dentre as vantagens, tem-se a não restrição de produtos que podem passar pelo processo de liofilização (FELLOEWS, 2000).

Os alimentos com sensibilidade ao calor, apresentam resultados insatisfatórios quando expostos aos métodos tradicionais, pois o aquecimento a altas temperaturas altera o sabor, textura, forma e ainda destrói os nutrientes. Na liofilização, o processo ocorre de forma diferente, em virtude de que este, ocorre a baixas temperaturas. Este processo também apresenta outra vantagem que é a redução de espaço para transporte e armazenamento do produto, porém deve-se ter cuidado com as embalagens do produto, as quais devem garantir total isolamento

hermético a fim de que não haja absorção de umidade, pois poderá ocorrer a degradação do alimento (VENIR *et al.*, 2007).

Em produtos como iogurtes e leites fermentados que contêm uma quantidade alta de água, ao serem liofilizados demonstraram outro comportamento, havendo que passar por um processo de reconstituição a fim de obter as características físicas e químicas semelhantes ao produto que o originou. Estudos têm sido realizados, a fim de obter resultados que demonstrem não haver alterações significativas em certos parâmetros como textura, sabor e aroma (YAMAGUCHI *et al.*, 2020).

Matos *et al.* (2015), realizaram um estudo verificando a estabilidade físico-química e microbiológica de iogurte natural liofilizado, durante o período de armazenamento e os resultados mostraram que certos parâmetros se mantiveram estáveis e a atividade das bactérias encontrava-se dentro da faixa estabelecida pela legislação vigente.

Yamaguchi *et al.* (2020), apresentaram a aplicação do processo de liofilização em iogurtes e expressaram resultados satisfatórios, comprovando que o processo é eficaz e permite obter um produto de fácil armazenamento e com características físico-químicas estáveis. As bactérias ácido-láticas mantiveram-se viáveis durante o período de armazenamento e o produto foi de fácil reconstituição no momento de consumo.

Os produtos lácteos por serem termossensíveis, tornam a liofilização um processo útil para sua desidratação mantendo a viabilidade das bactérias por um período maior. Muitos pesquisadores estudaram o processo de liofilização em leites fermentados e iogurtes e obtiveram resultados satisfatórios demonstrando que a liofilização neste tipo de produto o torna de grande valor aquisitivo (YAMAGUCHI *et al.*, 2019)

Assim, podemos constatar a importância da liofilização para produtos como leites fermentados, pois estes conservam o produto por um período de tempo maior mantendo suas características nutricionais e quando adicionados com probióticos, fornecem bem-estar e saúde aos consumidores, bem como a praticidade no uso desses produtos.

4. Capítulo 1 - *Lactobacillus* sp. H7 isolado de kefir na produção e caracterização de leite fermentado com adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta

4.1. Introdução

O consumo de alimentos saudáveis, que trazem bem-estar e benefícios para o organismo, incluindo os alimentos com propriedades funcionais, é uma tendência crescente entre os consumidores (TIAN *et al.*, 2021)

Dentre os alimentos funcionais, encontram-se os produtos adicionados de probióticos, estes microrganismos que quando ingeridos em uma concentração adequada oferecem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014).

Os produtos lácteos, se destacam quanto a adição destes microrganismos, em virtude da ação dos mesmos nesta matriz alimentícia, principalmente, pelo consumo dos carboidratos presentes no alimento com formação de ácidos orgânicos (prevalência do ácido láctico) que influenciam na textura, sabor e aroma dos produtos (KRUNIĆ; OBRADOVIĆ; RAKIN, 2019; TIAN *et al.*, 2021). *Lactobacillus* spp. estão entre as bactérias mais utilizadas na fermentação láctica, sendo considerado um dos probióticos mais frequentes em produtos lácteos probióticos, juntamente com *Bifidobacterium* spp. (SURENDRAN *et al.*, 2017; YERLIKAYA; SAYGILI; AKPINAR, 2021).

Os probióticos mostram-se benéficos para os consumidores por apresentarem comportamentos que auxiliam na regulação e equilíbrio da microbiota intestinal e entre outros benefícios. Por isso, vale salientar a importância de isolar e avaliar novas cepas que poderão vir a contribuir na saúde do consumidor evitar o avanço de certas doenças, além de ampliar a diversidade de produtos lácteos no mercado (RENSCHLER *et al.*, 2020).

Os principais efeitos benéficos apresentados pelos probióticos, relaciona-se ao aumento da motilidade intestinal, o que evita o crescimento e desenvolvimento de bactérias patogênicas, com a melhora das funções da barreira intestinal e com a

modulação da resposta imune, além do equilíbrio da microbiota intestinal e da melhora da digestibilidade (CORREIA *et al.*, 2012).

Devido a isto, é importante que os probióticos se mantenham em uma concentração de no mínimo 6 log UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹ do produto, para que possam contribuir com os efeitos benéficos no trato gastroinstenal e se desenvolver no organismo competindo com as bactérias patogênicas pelos sítios de adesão e se aderindo as células epiteliais prevenindo a eliminação por peristaltismo, proporcionando vantagem competitiva no ecossistema (PAPADOPOULOU *et al.*, 2018).

Entre os fatores que afetam a viabilidade das bactérias probióticas no produto, cita-se o estado fisiológico dos probióticos adicionados, as condições físicas de estocagem (tempo, temperatura), a composição química do produto no qual os microrganismos serão adicionados (acidez, conteúdo de carboidratos utilizáveis, fontes de nitrogênio, conteúdo mineral, atividade de água, conteúdo de oxigênio) e possíveis interações dos probióticos (bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) com outras culturas iniciadoras (ZEPEDA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2021).

A liofilização de alimentos, é um método de grande interesse, devido a praticidade que o uso desses alimentos proporciona, bem como a diminuição de volume e aumento da sobrevivência dos microrganismos no produto, devido ao processo que possibilita um prolongamento da atividade e estabilidade das bactérias nos alimentos. Isto se deve, à eficácia do método em conservar as características fisiológicas, morfológicas e metabólicas destes microrganismos. Estudos vem sendo realizados a partir do uso da liofilização como método de conservação e demonstraram que esse método tem efeitos menos nocivos sobre os microrganismos sensíveis em comparação com a secagem a temperatura ambiente (OBRADOVIĆ *et al.*, 2022).

No presente estudo objetivou-se avaliar o potencial probiótico e tecnológico de *Lactobacillus* sp. H7 isolado de kefir na produção de leite fermentado suplementado de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e polpa de amora-preta, submetido ao processo de liofilização.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material

Quatro amostras de kefir foram provenientes dos municípios de Pelotas e Rio Grande/RS, cedidas por indivíduos que consomem este produto e, o produzem artesanalmente, foram utilizadas neste estudo. No laboratório, os grãos de kefir, de cada amostra, foram adicionados em leite integral e mantidos a temperatura ambiente, até a coagulação do leite, em consequência da fermentação. Após, o leite fermentado foi filtrado, para separar os grãos do leite fermentado, e armazenado em temperatura de refrigeração, até a realização das análises de isolamento do kefir.

4.2.2. Isolamento e caracterização preliminar de bactérias ácido-láticas (BAL)

Para o isolamento das (BAL), foram realizados os procedimentos conforme Vitola *et al.* (2018), com algumas modificações. Uma porção de 25 mL de cada amostra de leite fermentado do kefir foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada 0,1%, em *stomacher*. Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi adicionada em 9 mL de água peptonada 0,1%, e a mistura submetida a diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% até a diluição 10^{-4} . Posteriormente, alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram transferidas para placas contendo ágar De Man Rogosa & Sharpe (MRS) (Acumedia®, Lansing, USA). O inóculo foi distribuído na superfície do ágar, com uma alça de Drigalski, acondicionadas em jarras de anaerobiose e incubação a 37 °C por 72 h.

Foram selecionadas, aleatoriamente, em torno de 10 colônias de cada amostra, totalizando 40 isolados, após estas foram purificadas e submetidas aos testes de coloração de Gram e catalase e, somente os isolados com características Gram-positiva e catalase-negativa, seguiram para os demais testes.

4.2.3. Avaliação dos parâmetros de segurança microbiológica dos isolados

4.2.3.1. Atividade da enzima Dnase

A produção da enzima DNase ocorreu a partir da inoculação dos isolados, previamente ativados em caldo MRS por 24 horas a 37 °C, para o ágar DNase. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em condições aeróbicas e para leitura dos resultados foi utilizada a solução de ácido clorídrico (100 mL) na concentração

de 1 N. O aparecimento de zonas transparentes ao redor da colônia dos isolados, indica resultado positivo para produção da enzima. Como controles positivo e negativo foram utilizados *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *L. sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521, respectivamente (KATEETE, *et al.*, 2010).

4.2.3.2. Atividade Hemolítica

A presença de hemolisinas foi realizada, a partir do cultivo das bactérias ácido lácticas em caldo MRS por 24 horas a 37 °C, em aerobiose. Após a ativação em caldo, os isolados foram transferidos para ágar Trypticase Soy (TSA) ((Acumedia®, Lansing, USA) suplementado, previamente, com 7% de sangue equino desfibrinado. Como controle positivo foi utilizada *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Após a incubação de 24 horas a 37 °C, a reação hemolítica foi avaliada observando tanto a lise parcial dos glóbulos vermelhos (α -hemólise), através do aparecimento de zonas verdes ao redor da colônia dos isolados bem como a lise total (β -hemólise), através do aparecimento de zonas transparentes (EATON; GASSON, 2001).

4.2.3.3. Atividade da enzima gelatinase

A atividade da enzima gelatinase foi determinada em meio de cultura preparado com 1% de extrato de levedura, 1,5% de triptona e 12% de gelatina. Os isolados foram ativados em caldo MRS por 24 horas a 37 °C, após foram transferidos para o meio contendo gelatina. Os tubos foram incubados a 30 °C por sete dias, ao final do sétimo dia os mesmos foram mantidos sob refrigeração (8 °C) por 30 minutos e, o resultado observado a partir do estado físico do meio de cultivo. A transformação do estado sólido para líquido do meio significa um resultado positivo para atividade da enzima. Como controles positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC e *Escherichia coli* ATCC 8739, respectivamente (PEREIRA *et al.*, 2009).

4.2.3.4. Suscetibilidade a antimicrobianos de uso clínico

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado de acordo com as recomendações propostas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019). A ativação dos isolados foi realizada em caldo MRS por 24 horas a 37 °C,

após ocorreu a padronização da turbidez em solução salina 0,85%, correspondendo 0,5 na escala de *McFarland* ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Com auxílio de swab estéril os isolados foram inoculados em placas de ágar Müller Hinton (MH) (Kasvi) e, então, sobre o ágar foram aplicados os discos contendo antimicrobianos (Laborclin). Dentre os antimicrobianos testados estão, ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 g), sulfanilamida (300 µg), tetraciclina (30g) e vancomicina (30µg). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e os resultados foram avaliados através das medidas dos diâmetros dos halos formados expressos como isolados resistentes, com sensibilidade intermediária ou sensíveis, de acordo com CSLI (2019).

4.2.3.5. Avaliação da presença de plasmídeo

A extração para verificar presença ou ausência de plasmídeo foi realizada de acordo com protocolo descrito no NucleoSpin© Tissue Kits (Macherey-Nagel, Alemanha) e a leitura do resultado através de eletroforese em gel de agarose (0,8%), sendo as quantidades utilizadas na corrida de 5µL de plasmídeo, 3µL de GelRed™, 3µL de tampão de carga, 500 mA, 150W, 150 V com duração de 45 minutos.

4.2.4. Testes tecnológicos

4.2.4.1. Tolerância a temperatura, pH, Sais biliares e NaCl

Os isolados foram ativados em caldo MRS por 18 horas a 37°C e realizou-se a avaliação em temperaturas de 8 °C (refrigerador) e 45 °C (estufa) durante 48 h, teste de tolerância a diferentes pH, baseado na modificação do pH no meio de cultivo, com solução de ácido clorídrico (HCl) P.A., para acidificação (pH 4,5) e solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N para alcalinização (pH 8,0), com incubação a 37 °C por 48 h. O teor de sal no caldo MRS foi modificado com cloreto de sódio (NaCl), em concentrações de 3% e 9% e incubação a 37 °C por 48 h. Para tolerância a sais biliares procedeu-se a inoculação dos isolados em placas contendo ágar MRS acrescidas de 0,2% de sais biliares. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 72 h, em anaerobiose. Os isolados que apresentassem resistência a bile, cresceriam normalmente no ágar.

Para todos os testes a leitura dos resultados foi obtida a partir da observação de turvação do caldo, indicando que os isolados conseguiram se multiplicar nestas condições.

4.2.4.2. Perfil Fermentativo

O teste foi realizado em caldo MRS com adição de 3% de glicose, com presença de tubos de Durham. Após a inoculação de 1% de inóculo dos isolados, os tubos foram incubados a 37 °C por 48 h. A turvação do caldo e a presença de gás nos tubos de Durham evidencia fermentação heteroláctica (formação de ácidos orgânicos e CO₂), enquanto turvação do caldo e a ausência de gás, caracteriza a fermentação homoláctica (produção de ácido láctico) (LEHNINGER *et al.*, 2002).

4.2.4.3. Fermentação de carboidratos e citrato

Para a realização do teste, seguiu-se a metodologia descrita por Lima *et al.*, (2009). Os testes de fermentação de carboidratos foram preparados utilizando-se um meio de cultura base, adicionado o carboidrato que será testado (1%) e acrescido de um indicador de pH (púrpura de bromocresol), com a redução do pH a coloração muda para amarela. Após 24h-48h de incubação a 37 °C, a leitura do resultado é verificada pela mudança de coloração para amarelo, indicando resultado positivo ou coloração vermelho-rosada indicando resultado negativo. No teste de citrato, o inóculo foi estriado no ágar citrato Simmons e incubadas a 24 horas por 37 °C. A alteração da cor de verde para azul, indica resultado positivo.

4.2.4.4. Identificação Molecular

Os isolados selecionados para identificação de gênero e espécie, foram submetidos a extração do DNA genômico, conforme Green & Sambrook (2012). A identificação genotípica foi realizada pelo sequenciamento da porção 16S do rDNA, cujas amostras foram enviadas à ACTGene LUDWIG-Análises Moleculares. O programa Contig Express (Vector NTI, Invitrogen) foi usado para analisar o fragmento sequenciado. A ferramenta BLAST do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi usada para comparar a similaridade do resultado com sequências depositadas no *GenBank*.

4.2.5. Avaliação *in vitro* do potencial probiótico

4.2.5.1. Capacidade de auto-agregação, co-agregação e Hidrofobicidade

Para avaliar a capacidade de auto-agregação, suspensões celulares dos isolados ativados em caldo MRS a 37 °C por 24h foram preparadas com auxílio de tampão fosfato salino (PBS), com absorbância ajustada para $0,25 \pm 0,02$ (10^7 - 10^8 UFC mL⁻¹) a 600nm em espectrofotômetro. O teste de auto-agregação foi determinado a 20 e 37 °C nos tempos de 2, 20 e 24 horas, onde foi medida a absorbância a 600nm e os resultados expressos em percentual, conforme a equação:

$$[1 - (A_{600nm} \text{ da suspensão final} / A_{600nm} \text{ da suspensão inicial}) \times 100].$$

Para determinar a capacidade de co-agregação dos isolados ao patógeno *Escherichia coli*, volumes iguais das suspensões celulares bacterianas foram misturados e incubados a 37 °C. A absorbância foi lida nos tempos de 2, 4 e 24 horas e os resultados expressos em percentual, conforme a equação:

$[(A_{pat} + A_{isol})/2 - (A_{mix}) / (A_{pat} + A_{isol})/2] \times 100$, onde A_{pat} e A_{isol} representam a absorbância das suspensões bacterianas dos isolados e do patógenos e, A_{mix} representa a absorbância das suspensões celulares misturadas (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2008).

Para avaliar a hidrofobicidade, foi observada a adesão bacteriana ao xileno (hidrocarboneto), onde 3 mL da suspensão celular dos isolados foi agitada em vórtex por 60 segundos com 400 µL de xileno, incubando-se por 2 horas a 37 °C. Posteriormente, a fase aquosa foi removida e a absorbância medida a 600 nm. O resultado lido em percentual de adesão, conforme a equação $[(A_0 - A) / A] \times 100$, onde A_0 e A são as absorbâncias antes e depois da extração com xileno, respectivamente (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003).

4.2.5.2. Atividade Antagonista contra patógenos

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados contra patógenos, os mesmos foram cultivados em caldo MRS e incubados a 37 °C por 24 horas. No centro da placa, uma alíquota de 10 µL do cultivo foi pingada em ágar, incubadas em anaerobiose a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação as placas foram recobertas com uma sobrecamada de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) semi-sólido,

contendo $\approx 10^5$ UFC.mL⁻¹ dos patógenos, *Escheria Coli* (EDL 933), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7466), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), incubando-se a 37 °C por 24 horas. Os resultados foram visualizados através de zonas de inibição ao redor do crescimento dos isolados de BAL, expressos em mm (FLEMING; ETCHELLS; COSTILOW, 1975).

4.2.5.3. Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)

A capacidade dos isolados em formar exopolissacarídeos, foi verificada através da inoculação dos isolados em placas de CRA (*Congo Red Agar*), e incubação a 37 °C por 24 horas. Como controles positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 258, respectivamente. Colônias negras com uma consistência seca e cristalina, foram consideradas como resultado positivo para produção de EPS (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989).

4.2.5.4. Teste de síntese de folato em meio de cultura

Para avaliar a produção de folato, a metodologia seguida foi a descrita por Laiño, LeBlanc e Savoy de Giori (2012), com modificações. O meio utilizado foi *Folic Acid Casei Medium* (FACM), sem folato, e incubação a 37 °C por 72 h. Os resultados foram lidos através da D.O a 630 nm. O procedimento foi repetido sete vezes para as culturas que apresentaram boa multiplicação no meio FACM.

4.2.6. Produção e caracterização de leite fermentado

4.2.6.1. Polpa liofilizada de amora-preta

A amora-preta do gênero *Rubus* sp. (cultivar Tupy), foi cultivada no campo experimental da Embrapa Clima Temperado (coordenadas 31°40'47"S e 52°26'24"W: 60 m altitude), e não foi submetida a nenhum tratamento fitossanitário. Os frutos inteiros, congelados, foram liofilizados (liofilizador Liobras® - L101), após a amostra foi triturada em moinho de bolas (Marconi - MA 350) e armazenada em ultra freezer (-80 °C). A caracterização da polpa de amora-preta liofilizada, consistiu de análises como: determinação do pH ((AOAC, 1995), acidez total titulável (AOAC, 1995), sólidos solúveis totais (AOAC, 1995), compostos fenólicos totais (SWAIN;

HILLIS, 1995), antocianinas (FULEKI; FRANCIS, 1968) e atividade antioxidante (VINHOLES *et al.*, 2011; VINHOLES *et al.*, 2014, com adaptações quanto a adição das amostras e reagentes nas microplacas.

4.2.6.2. Cultivo de *Lactobacillus* sp. H7

O cultivo do isolado H7, ocorreu em caldo MRS (por 18 horas a 37 °C, sob agitação constante a 130 oscilações/minuto em shaker (Agimaxx®). Depois o meio foi centrifugado a 4.165 g, por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e, ao *pellet* foi adicionado leite em pó reconstituído (10% m/v) e esterilizado, em seguida submetido ao congelamento a -70 °C, após liofilizado (Liotop L101, Liobras®), por 48 h. Contagens de células viáveis foram realizadas em ágar MRS, incubação à 37 °C, por 48 horas, sob anaerobiose (APHA, 2002). *Lactobacillus* sp. H7 liofilizada foi armazenada a -70 °C, até a aplicação na matriz alimentar.

4.2.6.3. Processo fermentativo - leite fermentado

A elaboração do leite fermentado, foi realizada com 2 L de leite integral pasteurizado (Santa Clara), e adicionado de 10% de sacarose (União), adquiridos em supermercado local, por conseguinte a mistura passou por tratamento térmico (95 °C/5 min), para reduzir a quantidade de oxigênio dissolvido e liberação de compostos nitrogenados de baixo peso molecular, que irão favorecer o desenvolvimento do isolado H7. Após, a mistura foi resfriada até a temperatura de 42 °C e, adicionou-se 1% do isolado *Lactobacillus* sp. H7 com incubação em iogurteira (Fun Kitchen), para fermentação do leite. A cada 2 horas, foi retirada uma alíquota de 10 mL da mistura e verificado pH e a acidez total titulável, durante todo o período de fermentação até atingir pH em torno de 4,5 a 4,7, sendo esta interrompida, com armazenamento em refrigeração. Após 24h, foi realizada a incorporação da polpa de amora-preta liofilizada (4%), goma guar (0,5%) e 0,01% da cultura probiótica liofilizada *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (10 log UFC.mL⁻¹) (Chr. Hansen), obtendo-se o leite fermentado probiótico com amora-preta. A formulação foi obtida, a partir de testes para alcançar as quantidades desejadas de cada um dos componentes do leite fermentado. O leite fermentado em estudo, consistiu de uma única formulação, porém separado em dois tratamentos: LF – leite fermentado no estado de gel, envasado em recipientes de vidro e o

segundo tratamento foi submetido ao processo de liofilização - LFLR (leite fermentado, liofilizado, reconstituído). Ambos foram armazenados em refrigeração (~ 4 °C), por 35 dias, sendo que o tratamento LFLR, foi armazenado no estado de pó e antes das análises era sempre reconstituído.

4.2.6.4. Reidratação do leite fermentado

Para o tratamento LFLR, foi estabelecido outra etapa, a reconstituição do mesmo, antes da realização das análises. As amostras de LFLR foram pesadas antes e após o processo de liofilização, verificando o quanto o leite fermentado perdeu de água, para então, reconstituí-lo com o mesmo volume, utilizando água destilada, mantida em refrigeração.

4.2.7. Análises físico-químicas do leite fermentado (LF e LFLR)

4.2.7.1. Determinação de pH e acidez titulável

A determinação do valor de pH foi realizada utilizando o equipamento pHmetro (Servylab®), enquanto a acidez total titulável foi realizada através de titulometria com NaOH 0,1 M expressa em % de ácido láctico/100g AOAC (1995). As análises foram realizadas nos tempos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento do produto.

4.2.7.2. Composição Centesimal

A composição centesimal do produto foi realizada, após 14 dias de armazenamento em refrigeração.

O percentual de umidade foi determinado pelo método de secagem em estufa a 105 °C e o percentual de cinzas determinado pelo método de incineração em forno mufla a 550 °C (AOAC, 1995).

Os teores de proteína, gordura e carboidratos foram realizados de acordo com os procedimentos descritos em AOAC (1995). A determinação de proteína foi realizada utilizando método de Kjeldahl o qual se baseia na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão e posterior destilação com liberação de amônia, seguida de titulação com ácido clorídrico 0,1N.

O percentual da fração protéica da amostra, foi calculado utilizando o fator 6,38, indicado para leite, tendo em vista que se considera que para cada 100g de proteína contém em média 16 g de nitrogênio.

O teor de gordura foi determinado pelo método de Soxhlet, utilizando o hexano como solvente. O teor de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de umidade, cinzas, gordura e proteínas expressos em $\text{g}\cdot 100^{-1}$ de amostra.

4.2.7.3. Compostos fenólicos totais

Para a análise de compostos fenólicos totais, 15 μL de amostra foram adicionados em 240 μL de água destilada e 15 μL de Folin-Ciocalteau (0,25 N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 725 nm. A quantidade de compostos fenólicos totais foi calculada e expressa em mg de ácido clorogênico por mL de extrato (BESKOW *et al.*,2015).

4.2.7.4. Antocianinas

A quantificação foi realizada de acordo com FULEKI e FRANCIS (1968), com algumas adaptações. Para a extração das antocianinas, em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 50 μL de amostra e 250 μL de etanol acidificado com HCl 1,5 N. A leitura foi realizada após 30 minutos em espectrofotômetro a 535 nm (Genesys 10UV). Cianidina-3-glicosídeo foi utilizada como referência para a curva de calibração (0-0,04 mg mL^{-1}) e os resultados expressos em mg de equivalente em cianidina-3-glicosídeo por 100 g de amostra.

4.2.7.5. Atividade Antioxidante frente ao radical DPPH

A capacidade de doação de átomos de hidrogênio pelos compostos presentes no leite fermentado foi determinada conforme Vinholes *et al.* (2011) e Vinholes *et al.* (2014) com algumas adaptações. Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 25 μL do extrato e 250 μL de solução de DPPH 0,6 mM. As placas foram agitadas e incubadas no escuro por 30 minutos e posteriormente foi realizada leitura em leitora de placas Spectra Max 190, a 515 nm.

4.2.8. Viabilidade de *Lactobacillus* sp. H7 e *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em leite fermentado sob o trânsito gastrointestinal (TGI) simulado

A avaliação da tolerância ao trato gastrointestinal foi realizada por meios que simulam as diferentes seções do TGI (esôfago/estômago, duodeno e íleo), com amostras aos 15 dias de armazenamento (semana 2). A análise seguiu o método descrito por Madureira et al. (2011). A realização da simulação *in vitro* foi feita de forma contínua, conforme ocorre durante a digestão. Os elementos reproduzidos foram as enzimas, sua concentração, o período de tempo e as intensidades de agitação nas quatro etapas simuladas (antes da fase gástrica – AG –, depois da fase gástrica – DG –, duodeno – D – e íleo – I –), para simular os movimentos peristálticos.

As contagens foram realizadas nas quatro fases, para ambos os tratamentos e, a contagem de células viáveis dos microrganismos foi realizada em ágar MRS. nas duas repetições, em triplicata.

4.2.8.1. Viabilidade de *Lactobacillus* sp. H7 e *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em leite fermentado sob armazenamento em refrigeração

As análises microbiológicas para o monitoramento da viabilidade de *Lactobacillus* sp. H7 e *B. lactis* BB12 foram realizadas em triplicata, com duas repetições, para ambos os tratamentos, após a preparação do leite fermentado – Tempo 0, 7, 14, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado a ~ 4 °C. Para determinação da contagem de células viáveis, 10 g de amostra foram homogeneizados em 90 mL de água peptona a 0,1% (Oxoid®). Na sequência, foram realizadas diluições decimais em série (até 10⁻¹⁰) e inoculados 0,1 mL da suspensão em placas de Petri contendo ágar Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Acumedia®, Lansing, USA) para o *Lactobacillus* sp. H7 e MRS suplementado com 0,5 g.L⁻¹ de cloreto de lítio, 0,75 g.L⁻¹ de propionato de sódio e 10 mL.L⁻¹ de cisteína a 10% para *B. lactis* Bb-12. As placas foram incubadas durante 72h a 37 °C. Para contagem *B. lactis* Bb-12 o procedimento foi realizado em condições anaeróbias e, para o *Lactobacillus* sp H7, em condições aeróbias (APHA, 2002).

4.2.9. Análises Microbiológicas do leite Fermentado

As análises quanto ao aspecto higiênico-sanitário do leite fermentado, foram realizadas após 14 dias de armazenamento em refrigeração. Foi avaliada a presença de *Salmonella*/25 mL, e realizadas contagens de *Escherichia coli*/mL e Bolores e Leveduras/mL preconizado pela IN 60/2019 (BRASIL, 2019), conforme APHA (2002).

4.2.10. Análise sensorial

A avaliação do leite fermentado por *Lactobacillus* sp. H7 e suplementado com cultura probiótica *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e polpa de amora-preta, foi realizada com 100 avaliadores não treinados. Cada avaliador recebeu duas amostras (LF e LFLR) contendo (\pm 15mL) de leite fermentado servido em copos plásticos descartáveis. A avaliação ocorreu, primeiramente, através do teste de preferência, para o avaliador identificar a sua amostra preferida e na sequência aplicou-se o teste de aceitação empregando uma escala hedônica de 5 pontos com os termos (1) desgostei muito e (5) gostei muito, avaliando de forma global cada amostra de leite fermentado. Este estudo foi submetido ao comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, aprovado e registrado em Plataforma Brasil/CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética), sob registro n°26087219.0.0000.5317.

4.2.11. Análise estatística

Análise de variância foi aplicada para avaliar efeitos principais e possíveis interações entre os fatores de tratamento. Ocorrendo efeito significativo, fatores de tratamento qualitativos com dois níveis foram comparados pelo teste T, diferentes fases do TGI foram consideradas como fator de tratamento qualitativo com quatro níveis e aplicado o teste de Waller-Duncan. Considerou-se o tempo como fator de tratamento quantitativo, sendo os resultados apresentados graficamente e comparados por intervalo de confiança (IC) a 95% de probabilidade ou ajustados modelos de regressão para melhor compreensão dos comportamentos biológicos. A seleção do modelo foi baseada no baixo valor de p e no alto valor de R^2 . A avaliação dos isolados F1 e H7 para atividade antagonista, autoagregação, co-agregação e hidrofobicidade seguiu um esquema unifatorial com dois níveis. A caracterização da

fermentação do leite pelo isolado H7 por meio do pH e acidez e a avaliação físico-química e fitoquímica, também foram arranjados em esquema unifatorial. Já as análises de pH e acidez do leite fermentado de amora preta, viabilidade das bactérias H7 e Bb-12 durante o armazenamento e simulação do TGI, foram arranjados em esquema bifatorial.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Caracterização dos isolados de BAL

Foram obtidos 40 isolados no total, provenientes das amostras de leite fermentado obtido a partir da fermentação de grãos de kefir, de diferentes procedências. Destes, 13 isolados de leite fermentado de kefir, apresentaram características de Gram-positiva e catalase negativa, estas são importantes para caracterizar bactérias ácido-láticas. Quanto a morfologia, com exceção de um isolado com morfologia de bacilo, os demais apresentaram a forma de cocos.

O kefir constitui-se de uma matriz com significativa diversidade de microrganismos (bactérias ácido-láticas, leveduras e bactérias acéticas) suspensos em uma matriz de polissacarídeos (grãos de kefir) (BENGOA *et al.*, 2019). Diversidade essa, comprovada pelos estudos que isolaram cepas de bactérias ácido-láticas de kefir como demonstrado em trabalho realizado por Bengoa *et al.* (2019), em que foram isolados *Lactobacillus* spp. de grãos de kefir na busca de utilização destas para o desenvolvimento de produtos lácteos.

Em trabalho realizado por Yerlikaya (2019), foram obtidas cepas oriundas de leite de vaca e grãos de kefir caracterizadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Realizou-se a análise quanto as suas propriedades probióticas e bioquímicas incluindo susceptibilidade a antibióticos, atividade lipolítica, descarboxilação de aminoácidos e atividade antioxidante. Dentre elas, as cepas de *Lactococcus lactis* provenientes de grãos de kefir, apresentaram melhores características em relação a atividade antimicrobiana e desconjugação de sais biliares.

Vieira *et al.*, (2017) analisaram cepas potenciais probióticas de bactérias ácido-láticas isoladas de grãos de kefir com o intuito de produzir ácido linoleico conjugado (CLA) durante a fermentação do leite. A cepa escolhida, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MRS 47 demonstrou propriedades probióticas e aumentou o

teor de CLA e ácidos graxos poliinsaturados mostrando sua capacidade de interferir no perfil de ácidos graxos durante a sua fermentação.

4.3.2. Testes de segurança microbiológica

Em relação aos aspectos de segurança, dos 13 isolados, apenas dois isolados (H7 e F1) demonstraram resultados negativos: *i*) para a presença das hemolisinas, com capacidade de lisar eritrócitos do sangue humano, *ii*) para a presença de enzimas DNase, que degradam os ácidos nucleicos, e *iii*) presença de gelatinase, que hidrolisam gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos, os demais apresentaram presença de Dnase, hemolisina e gelatinase, não sendo indicados a sua utilização em novos produtos

A escolha de cepas para serem utilizadas na elaboração de alimentos deve ser realizada, a partir de testes que indicam a patogenicidade, ou não, do microrganismo. Os testes de segurança, são testes que avaliam a presença de fatores de virulência nas cepas, e com isso, selecionam os microrganismos que poderão ser usados na elaboração de um produto, sem o risco de causar danos ao organismo do ser humano.

As BAL são consideradas bactérias seguras para serem aplicadas na elaboração de produtos, mas nem todas as espécies estão livres de possuir genes de virulência (PRADHAN *et al.*, 2019). É importante realizar testes que indicam a segurança destes microrganismos principalmente no caso de novas cepas sem histórico de uso seguro (PRADHAN; MALLAPPA; GROVER, 2020).

Pradhan, Mallappa, Grover (2020), relataram a presença de fatores de virulência em *Enterococcus* spp. como Dnase, hemolisina e gelatinase além da presença de genes estruturais. Embora genes associados a patogenicidade não tenham sido identificados em *Lactobacillus* spp., é significativo avaliar a presença de propriedades que manifestem virulência, como um critério de segurança.

Portanto, os dois isolados (H7 e F1), prosseguiram com as análises seguintes, pois obtiveram resultados satisfatórios em relação aos testes de segurança, os quais informam especificações quanto ao histórico de não-patogenicidade dos microrganismos.

4.3.2.1. Susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico

Na Tabela 1 abaixo, podemos observar os resultados de susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico testados nos isolados procedentes de kefir.

Tabela 1. Análise da susceptibilidade dos isolados de kefir (H7 e F1) a antimicrobianos de uso clínico

Isolados	PEN	VAN	TET	ERI	CIP	SUL	GEN	CLO
H7	R	R	S	S	S	R	S	S
F1	R	S	S	I	S	R	S	S

PEN:penicilina; VAN:vancomicina; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacina; SUL: sulfanilamida; GEN: gentamicina; CLO: cloranfenicol; S: sensível; R: resistente

Pode-se verificar que os dois isolados apresentaram resistência a penicilina e sulfanilamida este fato é preocupante pois, se aplicado nos alimentos, pode ocorrer a transferência dessa resistência a outras bactérias, podendo estas serem patogênicas.

Essa resistência também se mostra favorável no auxílio da microbiota intestinal, pois outras bactérias garantiriam seu crescimento atuando no sistema gastrointestinal e favorecendo o hospedeiro (NUNZIATA *et al.*, 2022).

Dentre os mecanismos de resistência a antimicrobianos têm-se a modificação enzimática do antimicrobiano, efluxo ativo das moléculas e modificação do alvo celular. As BAL apresentam uma variação quanto a resistência e susceptibilidade a antimicrobianos, sendo que muitos dos casos a resistência não é do tipo transmissível, mas representa uma característica intrínseca da espécie ou gênero essa resistência também pode ser adquirida transferida horizontalmente entre bactérias em consequência de mutações no genoma bacteriano. Certas espécies de BAL apresentam resistência intrínseca a vancomicina, assim como observado para o isolado *Lactobacillus* sp. H7 que apresentou resistência a este antimicrobiano (NOOHI *et al.*, 2021).

Nesse caso, é importante que se faça a análise de perfil plasmidial para verificar se a bactéria contém plasmídeo, pois a resistência a antimicrobianos geralmente é transmitida por plasmídeos ou por pequenos segmentos de DNA, designados por transposons os quais podem ligar-se de um pedaço de DNA para outro (NOOHI *et al.*, 2021).

Em trabalho realizado por Luz *et al.* (2021), foi relatado que entre os 8 dos 9 isolados de produtos lácteos apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado.

O principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos é através da produção de enzimas que apresentam grupos nucleofílicos (em geral, resíduos de serina) capazes de promover a abertura do anel β -lactâmico. Neste caso, a modificação molecular responsável pelo aumento de resistência às β -lactamases foi a introdução de grupamentos volumosos no carbono carbonílico da cadeia lateral em penicilinas semi-sintéticas (metecilina, oxacilinas), que impedem o acesso dos antibióticos ao sítio ativo da enzima β -lactamase por impedimento estérico (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

É fato de que como consequência do uso de antimicrobianos clínicos, ocorre o desequilíbrio da microbiota intestinal, sendo assim é importante manter um equilíbrio da microbiota, como das bactérias probióticas, com uma alimentação equilibrada, durante o seu uso para manter as funções intestinais benéficas à saúde do indivíduo.

4.3.2.2. Análise de presença de plasmídeo

Devido aos isolados H7 e F1, apresentarem resistência à penicilina, vancomicina e sulfanilamida, foi realizado a análise de perfil plasmidial, para verificar a presença ou ausência de plasmídeos em ambos os isolados. O resultado da eletroforese mostrou a ausência de plasmídeos, para ambos os isolados.

A ausência de plasmídeo é um indicativo para a utilização destas bactérias em alimentos, pois havendo a presença de plasmídeo, há a possibilidade de ocorrer transmissão destes genes de resistência por conjugação para microrganismos patogênicos e oportunistas. Os plasmídeos codificam informações como genes de resistência a antibióticos ou para a produção de toxinas. Podendo ocorrer troca de plasmídeos entre as bactérias (NUNZIATA *et al.*, 2022).

4.3.3. Testes Tecnológicos

Quando submetidos aos testes tecnológicos, observou-se que os dois isolados foram capazes de crescer em pH 4,5, mas não obtiveram o mesmo resultado quanto a pH 8,0. Isto demonstra uma capacidade de sobrevivência em pH

ácido sendo favorável para a utilização destes na elaboração de produtos lácteos. Quanto a temperatura, observou-se que os isolados cresceram a temperatura de 45°C, mas não se multiplicaram a 8 °C. Em relação ao crescimento em concentrações de NaCl e sais biliares, apenas o isolado H7 sobreviveu a concentração de 3% de NaCl e a concentração de 0,2% de sais biliares. Os aspectos tecnológicos desempenham um papel importante na escolha de microrganismos a serem aplicados na elaboração de produtos, estes devem ser passíveis de fornecer sabor e aroma característico e proporcionar efeitos positivos para a saúde do consumidor (LUZ *et al.*, 2021).

Vitola *et al.* (2018) demonstraram que dos 30 isolados, apenas 16 apresentaram tolerância às condições de pH 3,0 e pH 4,5, temperatura de 45 °C e concentrações de 3% e 9% de NaCl.

Os dois isolados (H7 e F1) apresentam perfil homofermentativo, sendo este satisfatório para a produção de produtos lácteos, vegetais e cárneos devido a produção de ácido láctico como principal produto da fermentação. O grupo heterofermentativo, produz ácido láctico, etanol ou acetato e CO₂ em quantidades equimolares. Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Vitola *et al.* (2018), em que todos os isolados (n=30) apresentaram perfil homofermentativo.

Quando testados em relação a fermentação de carboidratos (glicose, lactose, galactose, maltose, manose, frutose), os dois isolados (H7 e F1) apresentaram resultado positivo para todos os açúcares testados.

Na elaboração de produtos lácteos, como queijos, iogurtes e leites fermentados, a fermentação ocorre com a diminuição do pH, através do consumo de carboidratos e conseqüente formação de certos ácidos que auxiliam na inibição e proliferação de bactérias deteriorantes e patogênicas (ISLAM *et al.*, 2021).

Microrganismos que utilizam a via glicolítica produzem um maior percentual de ácido láctico a partir das hexoses, enquanto bactérias heterofermentativas utilizam a via das pentoses, produzindo outros produtos secundários como etanol, ácido acético e dióxido de carbono (SALVETTI *et al.*, 2013)

No presente estudo, foi possível verificar que os isolados (H7 e F1) não utilizam o citrato como fonte de carbono, demonstrando que algumas BAL são incapazes de metabolizá-lo devido à ausência da enzima citrato permease (CitP) (RAMOS *et al.*, 1994; BANDELL *et al.*, 1998).

No entanto, algumas BAL conseguem metabolizar o citrato, transformando-o em oxaloacetato e posteriormente em piruvato, o que poderá favorecer a produção de compostos como diacetil, acetato, acetoina e 2,3-butanodiol, estes com propriedades aromáticas, responsáveis pelo aroma típico de muitos produtos lácteos (MAYO *et al.*, 2010; MCSWEENY; SOUSA, 2000).

4.3.4. Identificação Molecular

Através de análise de sequenciamento do gene 16S rDNA, foi possível a identificação dos isolados, sendo que H7 foi identificado como *Lactobacillus* sp. H7 (número de acesso KY926700.1) e F1 como *Enterococcus thailandicus* F1 (número de acesso MN960654.1), ambos com 81% de similaridade com outras sequências de nucleotídeos depositadas no *Genbank*.

Em estudo realizado por Xiao *et al.* (2021), foram identificados isolados obtidos de grãos de kefir utilizando a sequência do gene 16S rRNA, e a cepa identificada como ZY-1 foi reconhecida como sendo *L. paracasei* devido ao alto grau de similaridade (até 99%).

4.3.5. Avaliação *in vitro* do potencial probiótico

4.3.5.1. Capacidade de auto-agregação, co-agregação

Auto-agregação e co-agregação apresentaram interação entre os fatores de tratamento (isolados x tempo) ($p=0.0001$). A comparação entre os isolados pode ser visualizada na Tabela 1, enquanto que o efeito do tempo na auto-agregação e na co-agregação para cada isolado, pode ser visualizada na Figura 1 (A) e (B), respectivamente.

Tabela 2. Percentual de auto-agregação e co-agregação em comparação com os isolados *Enterococcus thailandicus* F1 e *Lactobacillus* sp. H7, procedentes de kefir

Autoagregação	Isolados (%)	
Tempo (horas)	F1	H7
2	26,37 ± 2,49 ^a	13,25 ± 0,59 ^b
20	70,37 ± 2,02 ^a	65,40 ± 0,04 ^b

	87,54 ± 0,46 ^a	67,69 ± 0,24 ^b
Coagregação	Isolados %	
Tempo (horas)	F1	H7
2	43,76 ± 0,10 ^a	26,14 ± 0,30 ^b
4	53,98 ± 0,91 ^a	27,02 ± 2,51 ^b
24	59,47 ± 1,78 ^a	39,33 ± 1,52 ^b

*Autoagregação e co-agregação ao longo do tempo em horas dos isolados *Enterococcus thailandicus* F1 e *Lactobacillus* sp. H7

A auto-agregação e a co-agregação são importantes parâmetros para verificar se os microrganismos possuem propriedades probióticas. Os microrganismos capazes de se auto-agregar irão se aderir as células epiteliais evitando a eliminação por peristaltismo e permitindo assim vantagem competitiva no organismo. Na co-agregação, os microrganismos atuarão na criação de barreiras prevenindo a colonização intestinal por microrganismos patogênicos (LUZ *et al.*, 2021).

A capacidade de adesão as células epiteliais e superfície da mucosa respondem a características consideradas como pré-requisito para seleção de bactérias probióticas objetivando-se a colonização do trato gastrointestinal, prevenindo a eliminação por peristaltismo e promovendo vantagem competitiva na microbiota intestinal (LUZ *et al.*, 2021).

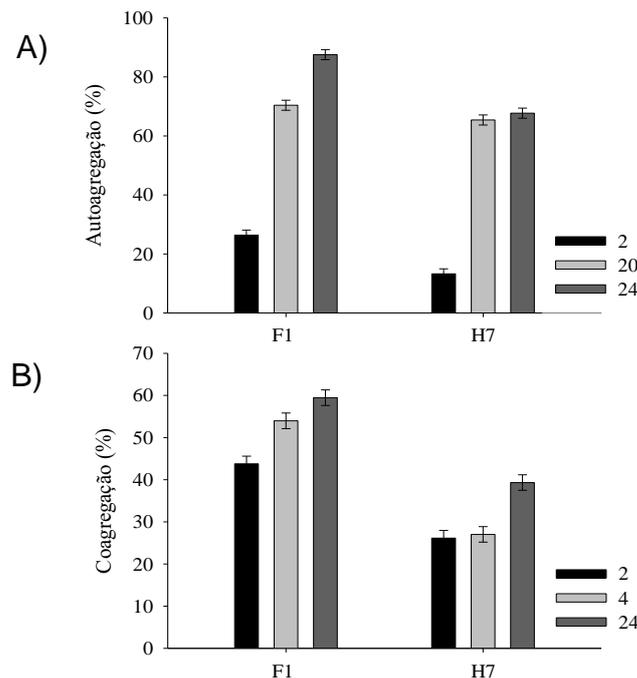


Figura 1- (A) Autoagregação ao longo do tempo em horas dos isolados F1 e H7 (IC = 3.4) e (B) co-agregação ao longo do tempo em horas dos isolados F1 e H7 (IC = 3.68). Barras verticais indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade sendo que a não sobreposição das barras indicam diferença significativa

Pode-se observar que os valores de auto-agregação dos isolados mantiveram-se, respectivamente, 87% e 67% para os isolados F1 e H7. Após 20 horas, os dois isolados demonstraram um aumento nos níveis a temperatura de 37 °C, sobretudo o F1 que ao final de 24 horas apresentou uma taxa de auto-agregação de 87%, indicando uma boa capacidade de se auto agregar.

Todorov *et al.* (2011) verificaram que o percentual de autoagregação de isolados de *L. curvatus* a 37 °C foi menor que 10%, indicando baixo nível de auto-agregação deste microrganismo, o mesmo ocorreu ao avaliarem a co-agregação deste isolado, que apresentou um percentual de 18%.

Em estudo realizado por Sui *et al.* (2021) demonstraram que o isolado *Lactobacillus plantarum* NF4 apresentou a maior taxa de auto-agregação durante 4h, 95% enquanto *L. plantarum* NF1 foi o que demonstrou menor taxa de auto-agregação e co-agregação.

Sabe-se que a auto-agregação e co-agregação entre os microrganismos tem papel importante na prevenção da colonização de superfícies por agentes patogênicos, no entanto é a habilidade de co-agregação de cepas de bactérias ácido-láticas que pode intervir na capacidade das espécies patogênicas em infectar

o hospedeiro e assim previnem a colonização de patógenos transmitidos por alimentos (GARCÍA-CAYUELA *et al.*, 2014).

Assim, no presente estudo, em relação a co-agregação observa-se que ao decorrer de 4 horas, houve um acréscimo na capacidade de co-agregação para os isolados, demonstrando boa capacidade de co-agregação frente ao patógeno *E. coli*.

Vitola *et al.* (2018) avaliaram isolados de silagem de colostro bovino e observou para co-agregação que os níveis aumentaram após 20 horas, especialmente o isolado SCL4 que ao final demonstrou um percentual de 60%, assemelhando-se aos valores encontrados no presente estudo para o isolado *Enterococcus thailandicus* F1.

Kouhi *et al.* (2022) relataram que as 10 cepas de *Enterococcus* sp. isoladas de queijo de leite cru tradicional no Irã apresentaram bons resultados para auto-agregação e co-agregação. O isolado 5A foi o que demonstrou maior capacidade de auto-agregação e co-agregação, 78,73% e 47,27%, respectivamente, valores estes menores que o encontrado no presente estudo para o isolado *Enterococcus thailandicus* F1.

Em estudo realizado por Rodríguez-Sánchez *et al.* (2021) das 28 cepas de *Lactobacillus* spp. isoladas de difentes alimentos e bebidas fermentados (berinjelas Almagro, queijos de cabra e ovelha e vinho), as taxas de auto-agregação após 2h variaram de 0% a 79,7% enquanto os valores após 4h de incubação variaram de 8,1% a 93,8%.

4.3.5.2. Hidrofobicidade

Em relação a hidrofobicidade, os resultados apresentaram diferença estatística ($p \leq 0.05$), visto que o isolado F1 apresentou o maior percentual de hidrofobicidade 26,93%, quando comparado ao isolado H7 12,67% demonstrando ter uma boa capacidade de adesão ao hidrocarboneto.

Sánchez *et al.* (2021) relatam valores que variaram de 0,6 % a 57,1 para as 28 cepas de *Lactobacillus*, sendo que a cepa de *Lactobacillus rhamnosus* Lb10 apresentou a maior taxa de hidrofobicidade, 57,1% e a de *Lactobacillus brevis* Lb99 manifestou a menor taxa 0,6%, mostrando que as BAL são naturalmente hidrofílicas e a hidrofobicidade é uma propriedade dependente da cepa, não assegurando que este microrganismo não é probiótico.

Marthara *et al.* (2008) caracterizam a hidrofobicidade como habilidade de aderência a hidrocarbonetos, onde, quanto maior o valor, maior a capacidade de adesão.

A hidrofobicidade ocorre entre as células microbianas e o hospedeiro. Esta interação pode ocorrer de forma mais fraca inicialmente, em certos momentos é reversível e precede os processos de adesão seguintes, mediados por mecanismos específicos envolvendo proteínas de superfície celular e ácidos lipoteicóicos. A adesão a hidrocarbonetos é caracterizada como um teste qualitativo para avaliar a capacidade de microrganismos em aderir-se as células epiteliais (SADRANI *et al.*, 2014; TODOROV *et al.*, 2011).

Em estudo realizado por Funck *et al.* (2019) o isolado de potencial probiótico *Lactobacillus curvatus* P99 apresentou uma hidrofobicidade de 13,97%.

Shahbazi, Nategui e Aghababayan (2016) relatam que a hidrofobicidade é afetada pela polaridade da membrana e a adesão desta á membrana do intestino. Estes também citam que a baixa porcentagem de hidrofobicidade pode estar envolvida ao tipo de organismo e a composição de ácidos graxos na parede celular da bactéria. Diferenças nos componentes de ácidos graxos podem estar entre as características que afetam a adesão e fluidez da membrana, bem como as interferências lipopeptídicas.

Em estudo realizado por Vitola *et al.* (2018) os valores de adesão para os isolados SCL3, SCL4 e SCL16 foram, respectivamente 14,52%, 15,03% e 12,81%, demonstrando não haver uma boa adesão aos hidrocarbonetos. Estes valores corroboram aos encontrados no presente estudo para o isolado *Lactobacillus* sp. H7 que foi de 12,67%.

4.3.5.3. Atividade Antibacteriana

Na tabela 3, podemos observar os valores referentes a atividade antagonista dos isolados *Lactobacillus* sp. H7 e *Enterococcus thailandicus* F1, frente a microrganismos patogênicos. Ambos os isolados apresentaram boa atividade antimicrobiana, tanto para bactérias Gram-positiva como para Gram-negativa, porém com variações no tamanho da zona de inibição, de acordo com os patógenos testados. A menor zona de inibição foi observada pela ação do isolado H7 contra *S.*

aureus, indicando uma limitada atividade contra este patógeno derivado da ausência de antagonismo por um dos mecanismos.

Tabela 3. Valores dos halos formados pela atividade antimicrobiana dos isolados *Lactobacillus* sp. H7 e *Enterococcus thailandicus* F1, provenientes de kefir

Microrganismo	Origem	Zonas de inibição (mm)	
		H7	F1
<i>Escherichia coli</i>	EDL 933	20 ± 0	18,6 ± 0,23
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7466	21,6 ± 0,23	33,3 ± 0,23
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028	22,6 ± 0,26	23 ± 0,16
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	8,3 ± 1,17	35 ± 0,37

ATCC: American Type Culture Collection; Valores expressos como médias e desvio padrão de triplicatas. EDL 933: também identificada como ATCC 700927

Muitas espécies de BAL são capazes de produzir compostos antimicrobianos, entre eles os ácidos orgânicos (como o lático, acético e propiônico), diacetil, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular e bacteriocinas. Estas substâncias apresentam efeito bacteriostático e/ou bactericida capazes de formar um ambiente desfavorável impedindo o crescimento e multiplicação de microrganismos patogênicos, sendo este um fator favorável na aplicação destas em alimentos por conferir qualidade e segurança ao produto (CASTELLANO *et al.*, 2008; ROUSE *et al.*, 2007).

Islam *et al.* (2021) relataram atividade antimicrobiana de 11 isolados de *Lactobacillus* provenientes de leite de cabra cru, sendo que todos apresentaram atividade antimicrobiana para os patógenos *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Escheria Coli* ATCC (25922) e *Enterobacter aerogenes* ATCC (13048). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LDMB02 e *Lacticaseibacillus casei* subsp. *casei* LDMB03 demonstraram maiores zonas de inibição 16-20mm frente ao patógeno *Escheria coli* (ATCC 25922).

A atividade antagonista contra microrganismos pode ocorrer por outros mecanismos como sensibilidade às interações microbianas, competição por nutrientes ou por sítios de adesão (ALVES *et al.*, 2006).

No estudo realizado por Vitola *et al.* (2018) os três isolados de silagem de colostro bovino demonstraram atividade antagonista contra patógenos, os resultados apresentados pelos isolado SCL3, SCL4 e SCL16 frente aos patógenos foram respectivamente, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) 26 mm, 35 mm e 27 mm, *Listeria monocytogenes* (7644) 22 mm, 21 mm e 19,5 mm, *Salmonella thiphymurium* (ATCC 14028) 17,5 mm, 28,5 mm e 23,5 e *Escherichia coli* (8739) 9 mm, 20,5 mm e 19 mm demonstrando valores que se assemelham aos isolados *Lactobacillus* sp. H7 e *Enterococcus thailandicus* F1 encontrados no presente estudo.

Kouhi *et al.* (2022) demonstraram que os 10 isolados de *Enterococcus* provenientes de queijo de leite de vaca no Irã apresentaram baixa atividade antagonista frente aos patógenos *Staphylococcus aureus* (PTCC 1764), *Bacillus cereus* (PTCC 1539), *Listeria monocytogenes* (PTCC 1163) *Escheria coli* (PTC 1276) *Salmonella enterica* (PTCC 1709). Os isolados 1TD, 1D,5C e 7Kb foram os que apresentaram maior atividade, > 11 mm contra o patógeno *Listeria monocytogenes* (PTCC 1163). Estes valores indicam uma baixa atividade antimicrobiana dos isolados, diferente do presente estudo que apresentou uma boa atividade antimicrobiana do isolado *Enterococcus thailandicus* F1, com variação de 18,6 a 35 mm no tamanho dos halos de inibição.

Em estudo realizado por Yerlikaya (2019) onde caracterizou isolados de leite de vaca e grãos de kefir, e realizou atividade antimicrobiana frente aos patógenos *S. enterica* subsp. *enterica* (CECT 443), *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (ATCC 13076), *B. cereus* (CECT 131), *L. monocytogenes* (CECT 932), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. aureus* (ATCC 12600), *E. coli* (ATCC 25922), *E. coli* (CECT4267) e *E. aerogenes* (ATCC13048). A cepa caracterizada como *L. lactis* K9 foi a que demonstrou maiores zonas de inibição (15 mm), especialmente frente a *L. monocytogenes* (7644).

4.3.5.4. Avaliação da produção de exopolissacarídeos

No presente estudo, foi avaliada a produção de exopolissacarídeos (EPS) para os isolados *Lactobacillus* sp. H7 e *Enterococcus thailandicus* F1, sendo observada a produção de EPS pelo isolado *Lactobacillus* sp. H7.

A síntese de EPS por BAL é considerada um atributo essencial, pois estes são capazes de modificar a aparência, propriedades reológicas e textura de produtos fermentados, devido a isto são vistos como compostos atraentes na elaboração de alimentos nas indústrias, principalmente de lácteos. Baixa viscosidade, fratura do gel ou alta sinérese são geralmente encontrados durante a elaboração de iogurte podendo ser resolvidos pela utilização de EPS com comportamento reológico pseudo-plástico e capacidade de ligação de água (SAADAT; KHOSROUSHAHI; GARGARI, 2019).

Alguns estudos apontam que, EPS produzidos pelas BAL mostraram apresentar características imunomoduladoras, anticancerígenas, antioxidantes agentes antibiofilme prevenindo a adesão de bactérias patogênicas (SAADAT; KHOSROUSHAHI; GARGARI, 2019)

Em estudo realizado por Islam *et al.* (2021) verificaram que a maior produção de EPS foi observada por *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* LDMB02 isolado de leite de cabra.

Diversas enzimas e proteínas têm sido relacionadas na biossíntese de EPS, sendo estas capazes de regular a expressão genica de produção de EPS por microrganismos (SAADAT; KHOSROUSHAHI; GARGARI, 2019).

4.3.5.5. Teste de produção de folato em meio de cultura

No presente trabalho, foi possível verificar que os isolados (H7 e F1) apresentaram crescimento em meio sem folato (caldo FACM), com incubação de 37 °C/72 h. A partir dos resultados da leitura da D.O (630 nm), que expressam valores superiores a 1, após sete cultivos consecutivos no meio FACM, ambos isolados demonstraram certa capacidade em produzir folato, mesmo com valores inferiores à cepa indicadora como produtora de folato *L. rhamnosus* 7469.

Isto indica que é necessário passar por outros testes para avaliar e afirmar a produção de folato pela bactéria, pois este teste em meio de cultura é uma avaliação preliminar da síntese de folato pelos isolados.

Em estudos realizados por Da Silva (2015), onde foi avaliado o potencial de BAL produtoras de folato e riboflavina isoladas de amostras de leite de cabra cru e queijos de cabra, dos 179 isolados, 151 (81,4%) apresentaram resultado positivo nos testes preliminares de produção de folato, indicando capacidade de se multiplicar em meio de cultura sem folato (meio FACM), em sete cultivos consecutivos neste meio.

Algumas BAL são passíveis de produzir vitaminas do grupo B, estes microrganismos apresentam bom potencial de uso tecnológico para produção de alimentos com teores mais altos de vitaminas do grupo B (LEBLANC *et al.*, 2011).

Estudos posteriores são necessários para avaliar a presença dos genes *folP*, *folE*, *folK*, *folQ*, *pabB*, *pabC*, nos isolados (H7 e F1) e avaliar a produção de folato (vitamina B9) (LAIÑO *et al.*, 2019).

Portanto, os resultados obtidos a partir dos testes *in vitro* realizados, demonstram que o isolado H7 apresenta potencial probiótico, tendo assim efeito benéfico ao atingir o trato gastrointestinal. Para que haja colonização dos microrganismos probióticos no organismo, é necessário que as concentrações sejam maiores ou iguais a $6 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$, quanto maior a concentração de células, maior vai ser a vantagem desta de ocupar o intestino (PAPADOPOULOU *et al.*, 2018). Bem como, é produtor de EPS, importante na viscosidade de produtos lácteos, determinando a aplicação de H7 na produção de leite fermentado, juntamente com uma cepa probiótica de uso comercial Bb-12 e adição de polpa de amora-preta.

4.3.6. Produção e caracterização de leite fermentado

4.3.6.1. Caracterização físico-química da polpa de amora-preta

A Tabela 4 abaixo, representa os resultados referentes as análises de caracterização da polpa de amora-preta obtida na Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS.

Tabela 4. Caracterização físico-química da polpa de amora-preta liofilizada

Análises	
pH	3,311
¹ Acidez (%)	1,26
*SST (°Brix)	10,2
² Antocianinas	1617,98
³ Compostos fenólicos	3301,49
⁴ Atividade antioxidante (DPPH)	40252,19

¹Expresso em % de ácido cítrico; *SST: Sólidos solúveis totais. ²Antocianinas totais expressa em mg/g de amostra; ³Compostos fenólicos totais expresso em mg/g de amostra; ⁴Atividade antioxidante frente ao radical DPPH expressa em %.

Entre os fitoquímicos encontrados, naturalmente, na amora-preta estão os ácidos fenólicos (gálico, hidroxibenzóico, cafeico, cumárico, ferúlico e elágico) e seus derivados, e, também, os flavonóides (catequina, epicatequina, miricetina, quercetina e kaempferol) benéficos para a saúde (PADILHA *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos relatam as propriedades dos fitoquímicos com ação antioxidante, em destaque os compostos fenólicos, os tocoferóis, o ácido ascórbico e os carotenoides, todos estes presentes na amora-preta. A amora apresenta atividade antioxidante sob os radicais superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila (OH^\cdot) e ao oxigênio (O_2) (WANG; JIAO, 2000).

Serraino *et al.* (2003) citam que estudos *in vitro* de extratos de amora-preta apresentaram efeito antioxidante ao radical peroxinitrito, protegendo as células de disfunções e falhas vasculares induzidas por este radical. Dentre os antioxidantes presentes na amora-preta, os encontrados constantemente, são os compostos fenólicos, como os flavonóides. Os benefícios obtidos desses compostos podem ser atribuídos à sua capacidade de sequestrar os radicais livres. Além dos compostos fenólicos, outros componentes possuem atividade antioxidante, estes todos presentes na amora-preta, como as vitaminas C e E e os carotenóides.

Estudos tem apresentado uma variação na quantidade de compostos fenólicos totais na amora-preta de 261,95 a 929,62 expressos em mg equivalente de ácido gálico.100g⁻¹ de fruta fresca. Esta variação na concentração de fenóis pode estar relacionada a diferença de metodologias empregadas na extração da amostra para a determinação dos fenóis totais, pela diferença de safra, clima ou pela localização das plantas (PADILHA *et al.*, 2010).

Dentre as espécies, a amora-preta *Rubus* sp. é que apresenta maior conteúdo de compostos fenólicos. Quanto as antocianinas, esta pode variar de acordo com o estágio de maturação das frutas. Estudos apresentam que seu conteúdo aumenta de 74,7 mg equivalente de cianidina-3- glicosídeo/100 g peso fresco em frutos ainda verdes para 317 mg cianidina-3-glicosídeo/100 g peso fresco em frutos sobremaduros (SIRIWOHARN; WROLSTAD, 2004).

Segundo Sellappan, Akoh e Krewer (2002), a variação no conteúdo de antocianinas entre cultivares pode ser bem acentuada, podendo variar de 12,70 a 197,34 mg.100g⁻¹ fruta.

Wang e Lin (2000) em estudo feito em frutos de amora-preta, framboesa e morango, os resultados indicaram que os frutos maduros de framboesa preta e de amora-preta, constituem fontes ricas em antocianinas (197,2 mg.100g⁻¹ fruta e 152,8 mg.100g⁻¹ fruta, respectivamente) quando comparados com frutos maduros de framboesa vermelha (68,0 mg.100g⁻¹ fruta) e de morango (31,9 mg.100g⁻¹ fruta).

No presente estudo, verifica-se que os frutos apresentaram quantidades maiores para fenóis, antioxidante e antocianinas, este fato pode ocorrer devido as variações genéticas, condições ambientais durante a colheita e pela ação enzimática na pós-colheita, principalmente devido a processos oxidativos das polifenoloxidasas, cujo principal substrato é a cianidina-3-glicosídeo.

Quanto a pH, acidez e sólidos solúveis totais (SST), os valores encontrados corroboram com o estudo realizado por Lameiro *et al.* (2019), apresentando respectivamente valores de pH, acidez e SST, 3,04, 1,15% e 8,00 °Brix.

4.3.6.2. Processo fermentativo- leite fermentado pelo isolado *Lactobacillus* sp. H7

O potencial de fermentação do leite pelo isolado H7 (9 log UFC.mL⁻¹) foi caracterizado pelo monitoramento do pH (A) e da acidez (B), durante o período de fermentação do leite (Figura 2 A e B, respectivamente).

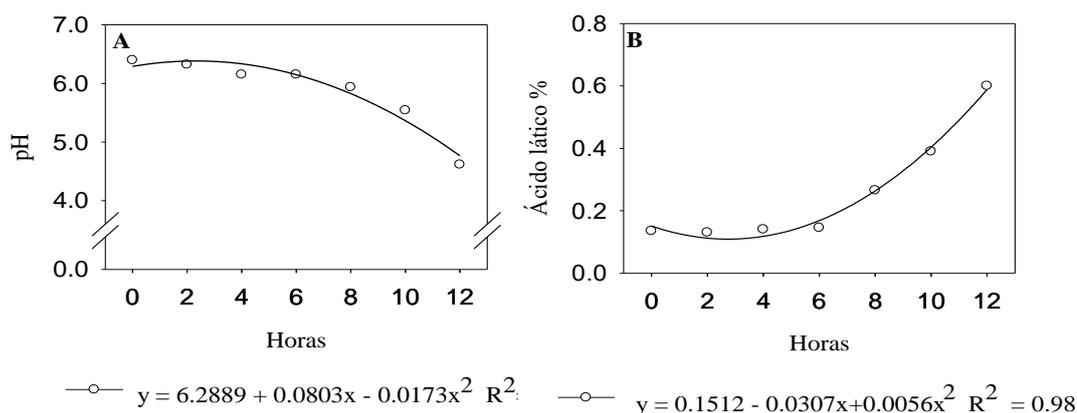


Figura 2 - Monitoramento do pH (A) e acidez (B) durante o processo fermentativo do leite pelo isolado *Lactobacillus* sp.H7

Ajustaram-se modelos de regressão polinomiais quadráticos, capazes de demonstrar que a partir de 6 horas, o comportamento inverso do pH e da acidez assumiram comportamento exponencial. Os valores preditos com base nos modelos de regressão estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados preditos de pH e acidez, a cada hora, a partir do tempo de 6h de fermentação do leite

Tempo (horas)	pH	Acidez (% de ácido láctico)
7	6,00	0,21
8	5,82	0,26
9	5,61	0,33
10	5,36	0,40
11	5,08	0,49
12	4,76	0,59

Podemos observar, durante o processo fermentativo, uma queda do pH e consequente elevação da acidez, resultado do consumo dos carboidratos pelo isolado H7, ocasionando a produção de ácido láctico. Observa-se que o isolado de kefir, demonstrou um bom potencial para fermentação, responsável pela redução de pH, atingindo pH 4,76 ao decorrer de 12 horas.

No decorrer da fermentação, uma molécula de glicose é oxidada em duas moléculas de ácido pirúvico. Essa oxidação gera a energia que é utilizada a fim de formar duas moléculas de ATP. Posteriormente, as duas moléculas de ácido pirúvico

são reduzidas por duas moléculas NADH, com intuito de formar duas moléculas de ácido láctico. Sendo o ácido láctico o produto final da reação, ele não sofre mais oxidação, e grande parte da energia produzida pela reação permanece armazenada no ácido. Portanto, essa fermentação produz somente uma pequena quantidade de energia (BENGOA *et al.*, 2019).

No gênero *Lactobacillus* estão as bactérias com forma de bacilos, estritamente fermentativas, aero-tolerantes ou anaeróbias, acidúricas ou acidófilas e fastidiosas (HAMMES e VOGEL, 1995). Representantes deste gênero tem a capacidade de fermentar o leite pela via homofermentativa, como principal produto o ácido láctico, por consequência diminui o pH do alimento aumentando o tempo de conservação e inibindo o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, bem como, auxiliam no sabor, odor e textura do produto (SALVETTI *et al.*, 2013).

À medida que o pH do meio vai diminuindo pela atividade das bactérias e consumo do substrato presente na matéria-prima, observa-se um aumento do conteúdo de cálcio no soro em função da solubilização do fosfato cálcico coloidal (CCP). A capacidade de união do cálcio e do magnésio iônico à micela não é alterada entre os pH 5,6 e 6,7, entretanto abaixo de 5,3 observa a solubilização do fosfato cálcico.

A alteração física da micela exerce um papel importante na formação do gel pela acidez. Os processos de dissociação e agregação da micela dependem do pH, da concentração iônica e da temperatura. As caseínas podem dissociar-se da micela quando o pH diminui, ainda que essa capacidade tenha sido apresentada principalmente na β -caseína. A diminuição do pH no leite também afeta as propriedades espaciais, visto que altera as interações eletrostáticas entre os grupos das caseínas e os sais. Ao diminuir o pH, ocorrerá redução das forças de repulsão entre as micelas induzindo-se as interações hidrofóbicas ocorrendo assim a coagulação do leite (SALVETTI *et al.*, 2013).

4.3.6.3. Leite fermentado com *Lactobacillus* sp. H7 suplementado com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora- preta

A partir do leite fermentado por *Lactobacillus* sp. H7 e suplementação com *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (10 log UFC.mL⁻¹) e polpa de amora- preta (4%), foram

preparados dois tratamentos de leite fermentado sendo que um deles, mantido no seu estado de gel (LF) e o outro liofilizado (LFLR). Após a liofilização, foi calculado a perda de água no tratamento LFLR, que ficou em 78,41%. Desta forma antes da realização das análises o LFLR era reconstituído, realizando a reidratação com o mesmo percentual de água sob refrigeração, que foi perdido no processo.

4.3.7. Determinação de pH e acidez

O pH apresentou apenas efeito principal significativo para o tempo ($p=0.008$), indicando que as operações unitárias de liofilização e de reconstituição não influenciaram no pH do leite fermentado.

Em trabalho realizado por Islam *et al.* (2021) observaram estabilidade no pH (4,54-4,56) do leite fermentado produzido durante os 21 dias de armazenamento corroborando com os resultados encontrados no presente estudo para o leite fermentado e o leite fermentado liofilizado reconstituído que apresentou um pH entre 4,3-4,2, respectivamente. Quanto à acidez, houve interações entre os fatores de tratamentos (formulações x tempo) ($p=0.0435$). Na comparação entre as formulações, é possível observar que a formulação LF apresenta acidez superior ou igual à formulação LFLR, Tabela 6.

Tabela 6. Acidez nas diferentes formulações de leite fermentado suplementado com *Bifidobacterium lactis* Bb-12 e amora-preta ao longo do armazenamento refrigerado

Tempo (dias)	LF	LFLR
0	1,38 ± 0,07 ^a	1,24 ± 0,01 ^b
7	1,22 ± 0,05 ^a	1,25 ± 0,13 ^a
14	1,09 ± 0,22 ^a	1,03 ± 0,09 ^a
21	1,02 ± 0,04 ^a	0,95 ± 0,01 ^b
28	1,07 ± 0,05 ^a	0,80 ± 0,06 ^b
35	1,05 ± 0,02 ^a	1,02 ± 0,03 ^a

LF = Leite fermentado; LFLR = Leite fermentado liofilizado reconstituído.

Médias ± desvio padrão com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste T ($p \leq 0.05$) na comparação entre os diferentes tratamentos.

A Tabela 6, apresenta os resultados de acidez ao longo dos dias, mostrando-se estáveis os valores ao longo do período de armazenamento, mas uma redução durante os dias 21 e 28 e uma elevação em 35 dias no leite fermentado liofilizado reconstituído.

As BAL têm influência na acidez e pH dos produtos, devido a produção de ácido láctico e outros metabólitos que influenciam na acidez do produto. Durante o armazenamento, a atividade metabólica das bactérias ácido-láticas nos alimentos pode contribuir para o aumento da acidez e conseqüentemente diminuição do pH (BORGONOVÍ; CASAROTTI; PENNA, 2021).

A influência do tempo sobre o pH e acidez pode ser observada na (Figura 3 A e B, respectivamente).

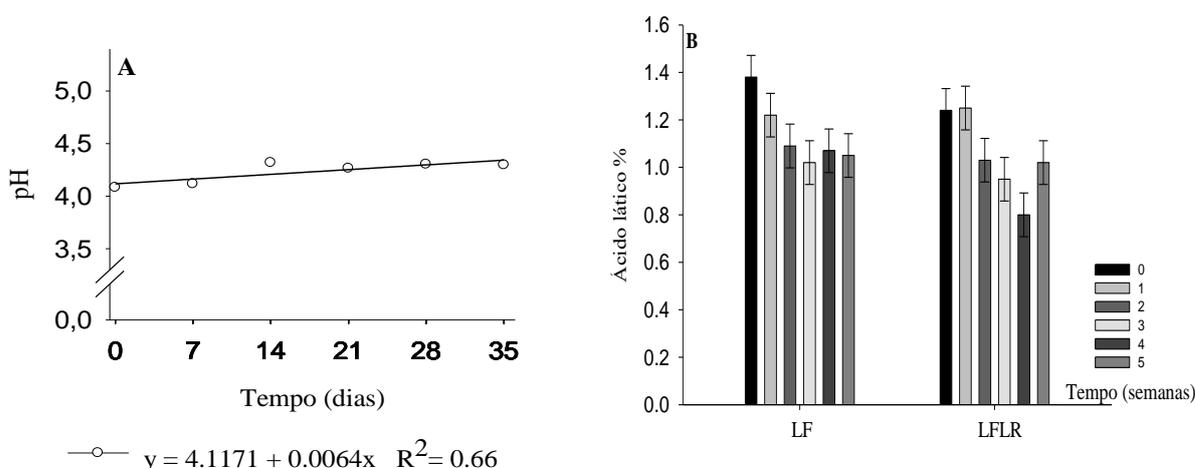


Figura 3 - pH (A) e acidez (B) em leites fermentados de amora-preta armazenados sob refrigeração (IC = 0.184).

Barras verticais indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade sendo que a não sobreposição das barras indicam diferença significativa.

Gallina *et al.* (2011) avaliaram o pH durante a vida útil de leites fermentados, apresentando resultados que demonstram a redução nos valores durante o período de armazenamento sob refrigeração, este fato está atrelado a atividade das bactérias e contínua produção de ácidos durante o metabolismo das mesmas.

Funck *et al.* (2019) realizaram a elaboração de dois tratamentos de bebida láctea, utilizando no tratamento T1 culturas iniciadoras de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (concentração 6 log UFC.mL⁻¹) e adição da cultura probiótica a 1% (v/v) *L. curvatus* P99 (concentração 7 log UFC.mL⁻¹) e C1 adição apenas das culturas iniciadoras e verificaram a acidez e o pH durante os 35 dias de armazenamento. Observaram que para os dois tratamentos T1 e C1 os valores de pH e acidez mantiveram-se estáveis durante o armazenamento, sendo que o tratamento T1 apresentou maiores valores de acidez

e conseqüentemente pH mais baixo demonstrando a influência da bactéria probiótica *L. curvatus* P99 no pH e acidez do alimento.

4.3.8. Viabilidade de *Lactobacillus* sp. H7 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 sob trânsito gastrointestinal (TGI) simulado

Os resultados para análise de TGI apresentaram interação entre os fatores de tratamento ($p \leq 0.05$), sendo os resultados apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Viabilidade de *Lactobacillus* sp. H7 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (log CFU g⁻¹) em leite fermentado e leite fermentado liofilizado reconstituído durante passagem no TGI

Fase do TGI	LF	LFLR
H7		
AG	7,48 ± 0,21 ^{aA}	7,29 ± 0,09 ^{aA}
DG	6,70 ± 0,22 ^{aB}	6,16 ± 0,23 ^{bB}
D	6,13 ± 0,06 ^{aC}	6,03 ± 0,06 ^{aBC}
I	5,99 ± 0,04 ^{aC}	5,93 ± 0,05 ^{aC}
Bb-12		
AG	7,83 ± 0,12 ^{aA}	7,97 ± 0,23 ^{aA}
DG	7,20 ± 0,16 ^{aB}	7,32 ± 0,09 ^{aB}
D	7,02 ± 0,04 ^{aC}	7,15 ± 0,05 ^{bBC}
I	6,98 ± 0,04 ^{aC}	7,02 ± 0,06 ^{aC}

LF = Leite fermentado; LFLR = Leite fermentado liofilizado reconstituído.

Médias ± desvio padrão com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste T ($p \leq 0.05$) na comparação entre os diferentes tratamentos. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Waller-Duncan ($p \leq 0.05$) comparando a evolução nas fases do TGI para cada formulação.

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* Bb-12, mesmo apresentando reduções durante as etapas, se manteve em uma concentração no leite fermentado e leite fermentado liofilizado reconstituído, respectivamente em 6,98 log UFC.mL⁻¹ e 7,02 log UFC.mL⁻¹, mostrando que a liofilização e a reidratação não afetam a viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12.

Observa-se um decréscimo na concentração do isolado H7 nos dois tratamentos, chegando na porção final do intestino em 5,99 ± 0,04 log UFC.mL⁻¹ para o leite fermentado e 5,93 ± 0,05 UFC.mL⁻¹, para o leite fermentado liofilizado reconstituído, demonstrando que o isolado H7, é sensível aos efeitos adversos do

trânsito gastrointestinal, mas pode ser considerado seu potencial probiótico, pois pode-se considerar que essa população é capaz de aderir à mucosa do intestino, colonizar os enterócitos e promover efeitos benéficos, sendo o mínimo recomendado de 6 log UFC.mL⁻¹.

Quando um alimento funcional adicionado de bactérias probióticas é produzido, é essencial que os microrganismos probióticos mantenham sua viabilidade, não somente, durante a elaboração e armazenamento do produto em questão, mas também ao longo da passagem do alimento, através do trato gastrointestinal (BORGONOVÍ; CASAROTTI; PENNA, 2021).

Entretanto, devido às condições do trato gastrointestinal, como presença de enzimas e sais biliares, a redução na viabilidade das células probióticas é um fato frequente nesse processo (GBASSI *et al.*, 2011; COOK *et al.*, 2012).

Alguns pesquisadores recomendam que as bactérias probióticas sobrevivam ao trato gastrointestinal, em concentrações iguais ou superiores a 6 log UFC.mL⁻¹ para então, conferir efeito benéfico esperado para o hospedeiro (BORGONOVÍ; CASAROTTI; PENNA, 2021; PAPADOPOULOU *et al.*, 2018).

O suco gástrico elaborado no estômago, geralmente, compõe a maior barreira para os probióticos (DEL PIANO *et al.*, 2011). A ação antimicrobiana da pepsina e o baixo pH são os principais fatores que afetam a sobrevivência dos probióticos (KAILASAPATHY, 2006).

O pH do estômago, geralmente, encontra-se em torno de 2,5 e 3,5, podendo ser menor, na faixa de 1,0 a 2,0, isso quando produzidos altas concentrações de suco gástrico, ou ainda podendo ser maior que 6,0 logo após a ingestão do alimento (HUANG, 2004; RANADHEERA *et al.*, 2012).

Após a passagem pelo estômago, os probióticos ingeridos veiculados com o alimento chegam ao intestino delgado onde são expostos à ação da pancreatina e dos sais biliares (RANADHEERA *et al.*, 2012), responsáveis pela redução de 35 a 40% na viabilidade destes microrganismos probióticos (DEL PIANO *et al.*, 2011).

No entanto, o efeito das condições do trato gastrointestinal sobre a viabilidade dos probióticos é dependente de alguns fatores, entre eles a escolha da matriz carreadora, considerada um fator bastante relevante, uma vez que a composição do alimento pode afetar a sobrevivência dos microrganismos no ambiente gastrointestinal (SANDERS *et al.*, 2010). Logo, os produtos lácteos são os mais

utilizados para a adição de microrganismos probióticos, devido estes possuírem certas características e componentes que auxiliam no desenvolvimento e produção de efeitos benéficos por estes microrganismos (ISLAM *et al.*, 2021).

4.3.8.1. Viabilidade de *Lactobacillus* sp. H7 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 sob armazenamento em refrigeração

A viabilidade de H7 e de Bb-12 apresentou interação ($p = 0.0016$) e ($p = 0.0001$), respectivamente entre os fatores de tratamento (formulação x tempo). A comparação entre as formulações em cada dia pode ser observada na tabela 8.

Tabela 8. Viabilidade de *Lactobacillus* sp. H7 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 em leite fermentado e leite fermentado liofilizado reconstituído durante armazenamento em refrigeração

Tempo (dias)	LF	LFLR
	H7	
0	8,90 ± 0,35 ^a	7,95 ± 0,12 ^b
7	8,02 ± 0,33 ^a	7,99 ± 0,31 ^b
14	7,48 ± 0,21 ^a	7,29 ± 0,09 ^a
28	7,28 ± 0,16 ^a	7,17 ± 0,13 ^a
35	7,28 ± 0,19 ^a	7,21 ± 0,06 ^a
	Bb-12	
0	9,75 ± 0,19 ^a	8,93 ± 0,06 ^b
7	8,48 ± 0,24 ^a	8,03 ± 0,08 ^b
14	7,83 ± 0,12 ^a	7,97 ± 0,23 ^a
28	7,50 ± 0,11 ^a	6,74 ± 0,30 ^b
35	7,46 ± 0,20 ^a	6,74 ± 0,17 ^b

LF = Leite fermentado; LFLR = Leite fermentado liofilizado reconstituído.

Médias ± desvio padrão com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste T ($p \leq 0.05$) na comparação entre os diferentes tratamentos.

Observa-se pela tabela 8, que as concentrações do isolado *Lactobacillus* sp. H7 mantiveram-se em contagens altas durante os 35 dias de armazenamento para os dois tratamentos. O mesmo ocorreu para *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

Jouki *et al.* (2021) relataram em seu estudo que a concentração de *L. plantarum* do iogurte liofilizado em pó, diminuiu durante o armazenamento enquanto o iogurte liofilizado em pó contendo microcápsulas adicionadas de sorbitol apresentaram maior viabilidade do microrganismo durante o armazenamento por 12 semanas, demonstrando ser uma opção na utilização do processo de liofilização.

A liofilização demonstra ser um processo alternativo para garantir a conservação de produtos, mas requer mais estudos para o melhoramento da viabilidade e atividade dos microrganismos (JOUKI *et al.*, 2021)

Na indústria de alimentos, este método também auxilia na diminuição de espaço para armazenamento, mas deve receber atenção as embalagens pois, a umidade pode acelerar o processo de deterioração (YAMAGUCHI, 2017).

A influência do tempo na viabilidade das bactérias *Lactobacillus* sp. H7 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 pode ser observada na Figura 4 A e B, respectivamente.

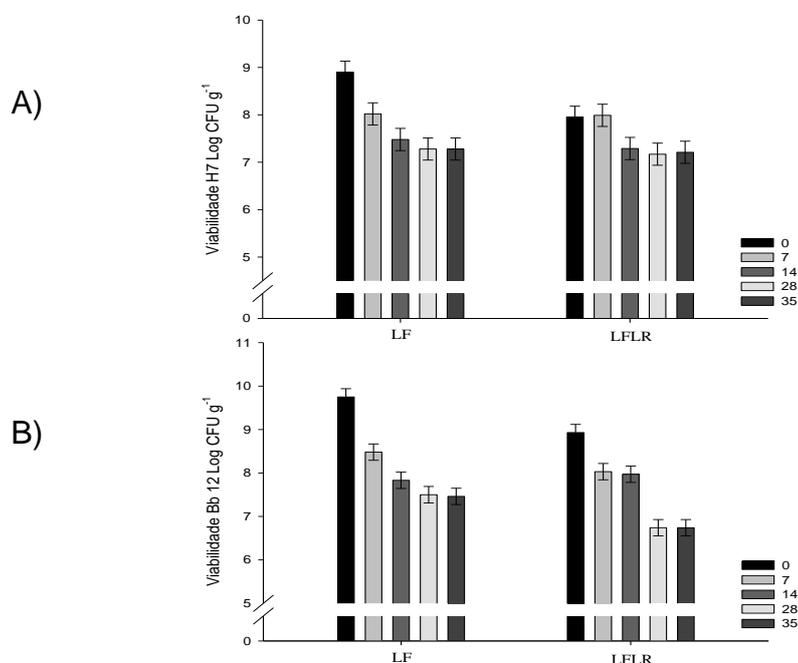


Figura 4- (A) Viabilidade ao longo do tempo de H7 (IC = 0.468) e (B) de Bb12 (IC = 0.375) em leite fermentado (LF) e em leite fermentado liofilizado reconstituído (LFLR). Barras verticais indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade sendo que a não sobreposição das barras indicam diferença significativa

A influência do tempo com relação ao isolado *Lactobacillus* sp. H7 para a formulação LF indicou uma redução significativa entre o tempo 0 e o dia 7 e entre o dia 7 e 14, seguido de uma estabilidade da viabilidade até 35° dia. Quanto ao LFLR, houve uma redução significativa no 14° dia. Contudo, pode-se perceber que o tempo afetou a viabilidade do isolado *Lactobacillus* sp. H7, reduzindo em ambas as formulações.

A bactéria probiótica *Bifidobacterium lactis* Bb-12, na formulação LF reduziu sua viabilidade no 7° e 14° dia, e após a mesma se manteve- estável. Na formulação liofilizada, houve declínio no 7° e no 28° dia em comparação ao tempo inicial, decorrido este tempo, manteve sua viabilidade estável.

Podemos observar que, mesmo havendo reduções em ambas às formulações, a viabilidade da *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 manteve-se acima de 6,5 log UFC.mL⁻¹, demonstrando que o método se torna eficaz para manutenção da viabilidade das células e armazenamento do produto por longo período.

Para o tratamento LFLR, foi avaliada aos 70 dias, a viabilidade de H7 e Bb-12, a fim de verificar a viabilidade destas bactérias em um período mais longo de armazenamento, os valores encontrados foram de 7,17 log UFC.mL⁻¹ e 7,03 log UFC.mL⁻¹, respectivamente.

4.3.9. Análises físico-químicas

A avaliação físico-química do leite fermentado não demonstrou diferença significativa para proteína, umidade, gordura, cinzas, fenóis, antocianinas e capacidade antioxidante ($p > 0.05$) (Tabela 9), indicando que as operações unitárias de liofilização e de reconstituição do leite fermentado não influenciam essas variáveis dependentes.

Tabela 9. Análises físico-químicas e fitoquímicas em leite fermentado e leite fermentado liofilizado reconstituído, suplementado com *Bifidobacterium lactis* Bb-12 e polpa de amora-preta

Análise	LF	LFLR
Umidade (%)	77,20 ± 0,05 ^{ns}	76,59 ± 2,42 ^{ns}
Proteína (%)	2,98 ± 0,89 ^{ns}	2,01 ± 0,92 ^{ns}
Gordura (%)	3,89 ± 0,72 ^{ns}	2,75 ± 0,97 ^{ns}
Cinzas (%)	0,89 ± 0,04 ^{ns}	0,84 ± 0,13 ^{ns}
Carboidratos (%)	15,04±32,32	17,81±32,36
^a Fenóis	711,28 ± 162,64 ^{ns}	627,60 ± 101,65 ^{ns}
^b Antocianinas	63,22 ± 16,76 ^{ns}	67,32 ± 7,54 ^{ns}
^c Capacidade antioxidante	18,29 ± 1,66 ^{ns}	24,01 ± 6,01 ^{ns}

LF = Leite fermentado; LFLR = Leite fermentado liofilizado reconstituído.

Médias ± desvio padrão

^aValores expressos em mg/g de amostra

^bValores expressos em mg/g de amostra

^cPercentual de redução do radical DPPH

Yamaguchi *et al.* (2020) ao avaliar as características físico-químicas e microbiológicas de iogurte liofilizado e reidratado, obtiveram valores de proteína para o iogurte liofilizado e não liofilizado respectivamente, 4,0% e 3,6%, divergindo dos valores encontrados no presente estudo que demonstraram redução deste componente, podendo esse resultado estar relacionado a reconstituição do leite fermentado, a adição de água no produto. Uma gama de produtos acompanhados de frutas e microrganismos probióticos têm sido exploradas no mercado, atualmente.

A adição de polpas de frutas em alimentos lácteos tem-se mostrado benéfica devido aos altos teores de compostos como fenóis, vitaminas, fibras e antioxidantes que além de contribuírem de forma nutricional, são capazes de aumentar a viabilidade e desenvolvimento de células probióticas (PRESTES *et al.*, 2021).

4.3.10. Análises Microbiológicas do leite fermentado

As análises microbiológicas de *Salmonella* spp., bolores e leveduras e *Escherichia coli*, indicam que ambos os tratamentos de leites fermentados apresentam parâmetros microbiológicos em concordância com os padrões da legislação vigente (Brasil, 2019).

4.3.11. Análise Sensorial

Primeiramente, os avaliadores identificaram a amostra do tratamento de sua preferência, onde 58% escolheram o tratamento LF, enquanto 42% escolheram a amostra do tratamento LFLR, como preferida.

Quanto ao teste de aceitação global dos tratamentos LF e LFLR, os resultados estão apresentados na Figura 5.

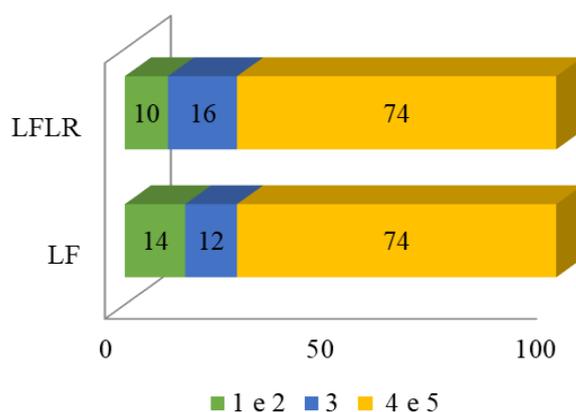


Figura 5- Classificação dos escores hedônicos em percentual dos leites fermentados (LF) e leite fermentado liofilizado reconstituído (LFLR), suplementado com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e polpa de amora-preta.

Pode-se observar que os dois tratamentos (LF e LFLR) tiveram uma boa aceitação quanto ao aspecto global, ao utilizar a escala de 5 pontos, onde 1 (desgostei muito) e 5 (gostei muito), mais de 70% dos avaliadores aprovaram o leite fermentado, independente do processo de liofilização/reidratação.

Possivelmente, nem a liofilização nem a reidratação afetaram as características sensoriais quanto ao aspecto global do leite fermentado, a ponto da maioria dos avaliadores não rejeitarem o produto. Apesar de diferirem quanto a escolha pela amostra de preferência, pois a maioria dos avaliadores definiram como preferida a amostrado tratamento LF.

4.4. Conclusão

Pode-se concluir que o isolado *Lactobacillus* sp. H7 apresenta potencial para elaboração de leite fermentado. Os testes de segurança microbiológica, tecnológicos e potencial probiótico, demonstraram resultados que levaram a utilização do isolado na produção do leite fermentado. Quanto a simulação ao TGI, os valores mostraram-

se acima de 5 log UFC.mL⁻¹ para H7 e para Bb-12 os valores foram superiores a 6 log UFC.mL⁻¹ durante o trânsito ao TGI, comprovando resistência aos sucos gástricos com estimativa de população microbiana conforme referência para probiótico. Durante os 35 dias de armazenamento em refrigeração, a viabilidade de H7 e Bb-12 foi superior a 6 log UFC.mL⁻¹. A liofilização demonstrou ser um tratamento viável para conservação e viabilidade das bactérias ácido-láticas, durante o armazenamento em refirgeração.

A adição de polpa de amora-preta contribuiu com as antocianinas, compostos fenólicos e antioxidantes no produto lácteo. O leite fermentado não liofilizado (LF) e o liofilizado (LFLR) foram avaliados sensorialmente, obtendo bons resultados quanto a aceitação, entretanto o tratamento LF foi considerado a amostra preferida entre os avaliadores. O leite fermentado liofilizado, fornece praticidade de preparo e fácil armazenagem e, com potencial probiótico propicia benefícios à saúde do consumidor.

Considerações finais

O kefir é caracterizado por ser um produto artesanal, que apresenta características que beneficiam o ser humano. Seu consumo e sua popularização tem aumentado muito pela facilidade de obtenção deste e, pelas propriedades que a bebida demonstra ao ser consumida. Estas características estão relacionadas as propriedades dos microrganismos contidos na sua estrutura, sendo muitas destas bactérias ácido-láticas. Assim, se torna interessante o isolamento de bactérias utilizando o kefir.

Entretanto, no presente estudo, do total de 40 isolados, apenas 2 seguiram para as demais análises por apresentarem resultados negativos para Dnase, gelatinase e hemolisina. Um resultado baixo se comparado ao número total de isolados, demonstrando um certo cuidado no momento do cultivo dos grãos, pois a microbiota do kefir pode variar com as condições locais do cultivo, origem dos grãos, acondicionamento e processamento de preparo.

O potencial tecnológico e probiótico destes isolados, mostraram bons resultados, entretanto o isolado identificado como *Lactobacillus* sp. H7 foi o escolhido para ser aplicado em um leite fermentado, pois apresentou capacidade de sintetizar exopolissacarídeos, sendo de interesse na elaboração de produtos como iogurtes e leites fermentados lácteos devido as propriedades reológicas que este proporciona nesse tipo de alimento.

Alimentos lácteos fermentados, tem sido cada vez mais, consumidos pela população, principalmente se estes demonstrarem efeitos benéficos à saúde, como os probióticos. Aliado a isso, a utilização de frutas em produtos lácteos demonstra ser um caminho para torná-lo mais nutritivo e atrativo para os consumidores.

Referências

AKPINAR, A.; SAYGILI, D.; YERLIKAYA, O. Production of set-type yoghurt using *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains with probiotic potential as starter adjuncts. **International Journal of Dairy Technology**, v. 73, n. 4, p. 726-736, 2020.

ALABURDA, J.; SHUNDO, L. Ácido fólico e fortificação de alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 66, n. 2, p. 95-102, 2007.

ALBAYRAK, Ç.B.; DURAN, M. Isolation and characterization of aroma producing lactic acid bacteria from artisanal white cheese for multifunctional properties. **LWT**, v. 150, p. 53-112, 2021.

ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.151-158, 2002.

ALVES, V. F.; MARTINEZ, R.C.R.; LAVRADOR, M.A.S.; DE MARTINIS, E.C.P. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science**, v. 74, p. 623-627, 2006.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16ª edição, 1995.

AOAC-Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 16. ed. Washington, DC, 1998.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, 2002. Disponível em: <https://www.apha.org/membership?gclid=CjwKCAjwy_aUBhACEiwA2IHHQMUS0HIFn-8-ub52e7LuqAxHoWJpxYqILAwA4IOKJWJepzBFQbK7qRoChV8QAvD_BwE> acesso em 03 de jun de 2022.

ATASSI, F.; SERVIN, A. L. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. **FEMS Microbiol Letters**, Amsterdam, v. 304, n. 1, p. 29-38, 2010.

BANDELL, M.; LHOTTE, M.E.; MARTY-TEYSSET, C.; VEYRAT, A.; PRÉVOST, H.; DARTOIS, V.; DIVIÈS, C.; KONINGS, W.N.; LOLKEMA, J.S. Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 5, p.1594-1600, 1998.

BACHTARZI, N.; KHARROUB, K.; RUAS-MADIEDO, P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim-milk fermentations. **LWT**, v. 107, p. 117-124, 2019.

BANWO, K.; OLOJEDE, A. O.; ADESULU-DAHUNSI A. T.; VERMA, D. K.; THAKUR, M.; TRIPATHY, S.; SINGH, S.; PATEL, A.R.; GUPTA, A.K.; AGUILAR, C.N.; UTAMA, G. L. Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101-320, 2021.

BARAT, A.; OZCAN, T. Growth of probiotic bacteria and characteristics of fermented milk containing fruit matrices. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 120-129, 2018.

BENGOA, A. A.; LLAMAS, M. G.; IRAPORDA, C.; DUENAS, M. T.; ABRAHAM, A. G.; GARROTE, G. L. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. **Food microbiology**, v. 69, p. 212-218, 2018.

BENGOA, A. A.; IRAPORDA, C.; ACURCIO, L. B.; DE CICCIO SANDES, S. H., COSTA, K.; GUIMARÃES, G. M.; ESTEVES ARANTES, R.M.; NEUMANN, E.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G. Physicochemical, immunomodulatory and safety aspects of milks fermented with *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir. **Food Research International**, v. 123, p. 48-55, 2019.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUEGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 85-278, 2008.

BESKOW, G. T.; HOFFMANN, J. F.; TEIXEIRA, A. M.; FACHINELLO, J. C.; CHAVES, F. C.; ROMBALDI, C. V. Bioactive and yield potential of jelly palms (*Butia odorata* Barb. Rodr.). **Food chemistry**, v. 172, p. 699-704, 2015.

BLAST-National Library of Medicine.<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BORGONOV, T.F.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A.L.B. Lacticaseibacillus casei SJRP38 and buriti pulp increased bioactive compounds and probiotic potential of fermented milk. **LWT**, v. 143, p. 111-124, 2021.

BRAGA, M. B.; VEGGI, P. C.; CODOLO, M. C.; GIACONIA, M. A.; RODRIGUES, C. L.; BRAGA, A. R. C. Evaluation of freeze-dried milk-blackberry pulp mixture: Influence of adjuvants over the physical properties of the powder, anthocyanin content and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 125, p. 108-557, 2019.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução n. 46, de 23 de outubro de 2007**. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. n. 205. Brasil, 2007.

BRASIL. Instrução Normativa n°60 de 23 de Dezembro de 2019. Aprova o “**Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor**”. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria colegiada.

CASALTA, E.; MONTEL, M.-C. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 271-273, 2008.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v. 79, p. 483-499, 2008.

CASAROTTI, S. N.; BORGONOV, T. F.; DE MELLO TIEGHI, T.; SIVIERI, K.; PENNA, A. L. B. 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. 109-453, 2020.

CHARM, S. E. The Fundamentals of Food. **Charm**. AVI Pub., 1971.

CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS. 17. 2015, São Carlos. **Anais**. ENEMP: Universidade Federal de São Carlos, 2015.5p.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, p. 56-67, 2012.

DA SILVA, F.F.P. **Bactérias lácticas produtoras de folato e riboflavina: Isolamento e avaliação do seu potencial de aplicação na produção de produtos lácteos caprinos com alto teor de vitaminas**. 2015. 55f. Tese de Doutorado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

DA SILVA, L. P.; PEREIRA, E.; PIRES, T. C.; ALVES, M. J.; PEREIRA, O. R.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. Rubus ulmifolius Schott fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties. **Food research international**, v. 119, p. 34-43, 2019.

DATTA, R.; TSAI, S. P.; BONSIGNORE, P.; MOON, S. H.; FRANK, J. R. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS microbiology reviews**, v. 16, n. 2-3, p. 221-231, 1995.

DE ALBUQUERQUE, T. L.; DE SOUSA, M.; E SILVA, N. C. G.; NETO, C. A. C. G.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROCHA, M. V. P. β -galactosidase from Kluyveromyces lactis: Characterization, production, immobilization and applications-A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 881-898, 2021.

DE OLIVEIRA, C. P.; DA SILVA, J.A. Leite fermentado probiótico e suas implicações na saúde. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 3, p. 3, 2011.

DE MELO PEREIRA, G. V.; DE OLIVEIRA COELHO, B.; JÚNIOR, A. I. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 8, p. 2060-2076, 2018.

DEL RE, B.; SQORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 438-442, 2000.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G.P. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, n.2, p. 248-255, 2006.

DEL PIANO, M.; CARMAGNOLA, S.; BALLARÉ, M.; SARTORI, M.; ORSELLO, M.; BALZARINI, M.; PAGLIARULO, M.; TARI, R.; ANDERLONI, A.; STROZZI, P.G.; MOGNA, L.; SFORZA, F.; CAPURSO, L. Is microencapsulation the future of probiotic preparations? The increased efficacy of gastro-protected probiotics. **Gut Microbes**, v. 2, 2, p.120-123, 2011.

DINIZ, R.O.; PERAZZO F.F.; CARVALHO, J.C.T.; SCHNEENEDORF, J.M. Atividade anti-inflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n. 1, p. 19-21, 2003.

DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S.; MAHONY, O.L.; HALLORAN, O, S.; FEENEY, M.; MORRISSEY, D.; THORNTON, G.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; QUIGLEY, M.M.E.; GERALD, C. O. S.; SHANAHAN, F.; COLLINS, K.J. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 76, n. 1-4, p. 279-92, 1999.

EL-GAWAD, I. A. A.; EL-SAYED, E. M.; HAFEZ, S. A.; EL-ZEINI, H. M.; SALEH, F. A. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 1, p. 37-44, 2005.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

FAO/WHO. Food and Agricultural Organization of the United Nations; World Health Organization. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canada, 2002.

FELLOEWS, P. J. Food Processing Technology: Principles and Practice. 2nd Edition. **Woodhead Publishing**, Limited.2000.

FIELD, D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p. 1-6, 2018.

FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUNOZ-QUEZADA, S.; GIL, A. Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, London, v. 109, n. 2, p. 35-50, 2013.

FUNCK, G. D.; MARQUES, J. D. L.; CRUXEN, C. E. D. S.; SEHN, C. P.; HAUBERT, L.; DANNENBERG, G. D. S.; KLANJ, V.M.; DA SILVA, W.P.; FIORENTINI, A. M. Probiotic potential of *Lactobacillus curvatus* P99 and viability in fermented oat dairy beverage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 12, p. 86-142, 2019.

GALLINA, D. A.; ALVES, A. T. S.; TRENTO, F. K. H. S.; CARUSI, J. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. UNOPAR Científica. **Ciências biológicas e da saúde**, Londrina, v. 13, n.4, p.239- 244, 2011.

GARCÍA-CAYUELA, T., KORANY, A. M., BUSTOS, I., DE CADIÑANOS, L. P. G., REQUENA, T., PELÁEZ, C. e MARTÍNEZ-CUESTA, M. C. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, 57, 44-50.2014.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; YOLOU, F. S.; MARCHIONI, E. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 2, p. 97-102, 2011.

GONZÁLEZ-OROZCO, B. D.; GARCÍA-CANO, I.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; ALVÁREZ, V. B. Invited review: Milk kefir microbiota—Direct and indirect antimicrobial effects. **Journal of Dairy Science**, 2022.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA, L. M.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUT, A. M.; VASILJEVIC, T.; YEAGER, T.; DONKOR, O. N. Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. **Journal of Functional Foods**, v. 58, p. 56-66, 2019.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GÖKIRMAKLI, Ç.; GREENE, A. K. A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

HAJIKHANI, R.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, n. 2, p. 105-108, 2007.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R.F. The genus lactobacillus. In: **The genera of lactic acid bacteria**. Springer, Boston, MA, p. 19-54, 1995.

HARTE, F.; LUEDECKE, L.; SWANSON, B.; BARBOSA-CANOVAS, G.V. Low-fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 1074-1082, 2003.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73, p. 374–379, 2001.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** 11, 506–514, 2014.

HIRSCH G. E. **Valor nutricional e capacidade antioxidante de diferentes genótipos de amora-Preta (*Rubus sp*)**. 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

HUANG, Y. et al. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propioni bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 253–260, 2004.

ILAVENIL, S.; VIJAYAKUMAR, M.; KIM, D. H.; VALAN ARASU, M.; PARK, H. S.; RAVIKUMAR, S.; CHOI, K. C. Assessment of probiotic, antifungal and cholesterol lowering properties of *Pediococcus pentosaceus* KCC-23 isolated from Italian ryegrass. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 2, p. 593-601, 2016.

ISLAM, M. Z.; UDDIN, M. E.; RAHMAN, M. T.; ISLAM, M. A.; HARUN-UR-Rashid, M. Isolation and characterization of dominant lactic acid bacteria from raw goat milk: Assessment of probiotic potential and technological properties. **Small Ruminant Research**, v. 205, p. 106532, 2021.

ISO International Organization for Standardization. **Sensory analysis-methodology- General guidance for conducting hedonic tests with consumers in a controlled area.** ISO 11136: 2014. Geneva, Switzerland, 2014.

JACQUES, A. C. Estabilidade de compostos bioativos em polpa congelada de amora-preta (*rubus fruticosus*) cv.tupy. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1720-1725, 2010.

JAMPAPHAENG, K.; COCOLIN, L.; MANEERAT, S. Selection and evaluation of functional characteristics of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional fermented stinky bean (Sataw-Dong). **Annals of microbiology**, v. 67, n. 1, p. 25-36, 2017.

JEONG, D.; KIM, D. H.; KANG, I. B.; KIM, H.; SONG, K. Y.; KIM, H. S.; SEO, K. H. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. **Food Control**, v. 78, p. 436-442, 2017.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT— Food Science and Technology**, v.39, p. 1221– 1227, 2006.

KER-SIN, N.G.; WANG, S.Y.; CHEN, M.J. A novel immobilized cell system involving Taiwanese kefir microorganisms and sugar cane pieces for fermented milk production. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 1, p. 141-149, 2020.

KOUHI, F.; MIRZAEI, H.; NAMI, Y.; KHANDAGHI, J.; JAVADI, A. Potential probiotic and safety characterisation of *Enterococcus* bacteria isolated from indigenous fermented Motal cheese. **International Dairy Journal**, v. 126, p. 105247, 2022.

KRUNIĆ, T. Ž.; OBRADOVIĆ, N. S.; RAKIN, Marica B. Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture. **Food chemistry**, v. 293, p. 74-82, 2019.

LAMEIRO, M. D. G. S.; MACHADO, M. I. R.; MACHADO, A. R.; ZAMBIAZI, R. C. Características físico-químicas da amora-preta (*rubus fruticosus*) e mirtilo (*vaccinium ashei*) em seus produtos liofilizados. **Global Science and Technology**, v. 12, n. 1, 2019.

LAIÑO, J. E.; LEVIT, R.; DE LEBLANC, A. D. M.; DE GIORI, G. S.; LEBLANC, J. G. Characterization of folate production and probiotic potential of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* CRL415. **Food microbiology**, v. 79, p. 20-26, 2019.

LAIÑO, J. E.; ZELAYA, H.; JUÁREZ DEL VALLE, M.; SAVOY DE GIORI, G.; LEBLANC, J. G. Milk fermented with selected strains of lactic acid bacteria is able to improve folate status of deficient rodents and also prevent folate deficiency. **Journal of Functional Foods**, v. 17, n. September, p. 22–32, 2015.

LEBLANC, J. G.; LAIÑO, J. E.; DEL VALLE, M. J.; VANNINI, V.; VAN SINDEREN, D.; TARANTO, M. P.; DE VALDEZ, G. F.; DE GIORI, G. S.; SESMA, F. B-group vitamin production by lactic acid bacteria-current knowledge and potential applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1297- 1309, 2011.

LERNER, A.; SHOENFELD, Y.; MATTHIAS, T. Probiotics: if it does not help it does not do any harm. Really?. **Microorganisms**, v. 7, n. 4, p. 104, 2019.

LEVIT, R.; SAVOY DE GIORI, G.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; LEBLANC, J. G. Recent update on lactic acid bacteria producing riboflavin and folates: application for food fortification and treatment of intestinal inflammation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 5, p. 1412-1424, 2021.

LIMA, K. G. de C.; KRUGER, M. F.; BEHRENS, J.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; GOMBOSSY DE MELO FRANCO, B. D. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.2, p.491–495, 2009.

LUZ, C.; CALPE, J.; QUILES, J. M.; TORRIJOS, R.; VENTO, M.; GORMAZ, M.; MAÑES, J. MECA, G. Probiotic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product. **Journal of Functional Foods**, v. 84, p. 104599, 2021.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock Biology of Microorganisms*. 8 ed. **Prentice Hall International**. 986 p.,1997.

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

MAYO, B.A.; PIEKARCZYK, T.; FERNÁNDEZ, M.; KOWALCZYK, M.; ÁLVAREZ, M P.; BARDOWSKI, J. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. Blackwell Publishing, USA, p. 3-33, 2010.

MANTZOURANI, I.; TERPOU, A.; BEKATOROU, A.; MALLOUCHOS, A.; ALEXOPOULOS, A.; KIMBARIS, A.; PLESSAS, S. Functional pomegranate beverage production by fermentation with a novel synbiotic *L. paracasei* biocatalyst. **Food chemistry**, v. 308, p. 125-658, 2020.

MARTÍN, R. et al. Probióticos: concepto, criterios de selección y seguridad. In: RODRÍGUEZ, J. M. G. (Ed.). La leche humana, un alimento vivo: bacterias probióticas en leche humana. Granada: **Puleva Food**, cap. 104-121, p.234, 2010.

MARTÍN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.27, p.15-25, 2015.

MATHARA, J. M.; SCHILLINGER, U.; KUTIMA, P. M.; MBUGUA, S. K.; GUIGAS, C.; FRANZ, C.; HOLZAPFEL, W. H. Functional Properties of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Maasai Traditional Fermented Milk Products in Kenya. **Current Microbiology**, v. 56, p. 315-321, 2008.

MCSWEENEY, P.L.H.; SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. **Lait** 80, 293–324, 2000

MOHAMMED, S.; ÇON, A.H. Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from traditional cheese. **LWT**, v. 152, p. 112319, 2021.

MOJGANI, N.; HUSSAINI, F.; VASEJI, N. Characterization of indigenous *Lactobacillus* strains for probiotic properties. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 8, n. 2, 2015.

MORIANO, M. E.; ALAMPRESE, C. Honey, trehalose and erythritol as sucrose-alternative sweeteners for artisanal ice cream. A pilot study. **LWT**, v. 75, p. 329-334, 2017.

NOOHI, N.; PAPIZADEH, M.; ROHANI, M.; TALEBI, M.; POURSSHAFIE, M.R. Screening for probiotic characters in lactobacilli isolated from chickens revealed the intra-species diversity of *Lactobacillus brevis*. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 119-126, 2021.

OBRADOVIĆ, N.; VOLIC, M.; NEDOVIC, V.; RAKIN, M.; BUGARSKI, B. Microencapsulation of probiotic starter culture in protein–carbohydrate carriers using spray and freeze-drying processes: Implementation in whey-based beverages. **Journal of Food Engineering**, p. 110-948, 2022.

OLUWATOSIN, S.O.; TAI, S.L.; FAGAN-ENDRES, M.A. Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic–towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic. **Biotechnology Reports**, v. 33, p. 006-96, 2022.

ORDOÑEZ, J. A. O.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ALVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLON, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. Tecnologia de Alimentos. In: **Alimentos de Origem Animal**. 2. ed. Artmed. 2005. 279p.

PADILHA, M. M.; MOREIRA, L. Q.; MORAIS, F. F.; ARAÚJO, T. H.; ALVEZ-DA-SILVA, G. Estudo Farmacobotânicos das Folhas de 50 Amoreira-Preta, *Morus nigra* L., Moraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p. 621-626, 2010.

PAPADOPOULOU, O. S.; ARGYRI, A. A.; VARZAKIS, E. E.; TASSOU, C. C.; CHORIANOPOULOS, N. G. Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and safety using a *Lactobacillus plantarum* strain with probiotic potential. **Food microbiology**, v. 74, p. 21-33, 2018.

PISANO, M. B.; VIALE, S.; CONTI S.; FADDA, M. E.; DEPLANO, M.; MELIS, M. P.; COSENTINO, S. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. **BioMed research international**, v. 2014.

PRADHAN, D.; MALLAPPA, R.H.; GROVER, S. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. **Food Control**, v. 108, p. 106872, 2020.

PRADHAN, D.; SINGH, R.; TYAGI, A.; RASHMI, H. M.; BATISH, V. K.; GROVER, S. Assessing safety of *Lactobacillus plantarum* MTCC 5690 and *Lactobacillus fermentum* MTCC 5689 using in vitro approaches and an in vivo murine model. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 101, p. 1-11, 2019.

PRESTES, A.A.; VERRUCK, S.; VARGAS, M.O.; CANELLA, A.H.M.; SILVA, C.C.; BARROS, E.L.S.; DANTAS, A.; DE OLIVEIRA, L.V.A.; MARAN, B.M.; MATOS.M.; HELM, C.V.; PRUDENCIO, E.S. Influence of guabiroba pulp (*campomanesia xanthocarpa* o. berg) added to fermented milk on probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 141, p. 110-135, 2021.

QUÍLEZ, J.; DIANA, M. Gamma-aminobutyric acid-enriched fermented foods. In: **Fermented foods in health and disease prevention**. Academic Press, 2017. p. 85-103.

RAMCHANDRAN, L.; SHAH, N. P. Effect of exopolysaccharides on the proteolytic and angiotensin-I converting enzyme-inhibitory activities and textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 3, p. 895-906, 2009.

RAMOS, A.; POOLMAN, B.; SANTOS, H.; LOLKEMA, J.S.; KONINGS, W.N. Uniport of anionic citrate and proton consumption in citrate metabolism generate a proton motive force in *Leuconostoc oenos*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 16, p. 4899-4905, 1994.

RAMOS, S.; SALAZAR, M.; NASCIMENTO, L.; CARAZZOLLE, M.; PEREIRA, G.; DELFORNO, T.; NASCIMENTO, M.; DE ALELUIA, T.; CELEGHINI, R.; EFRAIM, P. Influence of pulp on the microbial diversity during cupuassu fermentation. **International journal of food microbiology**, v. 318, p. 108-465, 2020.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619-625, 2012.

REID, G.; HAMMOND, J.A. Probiotics: some evidence of their effectiveness. **Canadian Family Physician**, v.51, p.1487-1493, 2005.

RENSCHLER, M. A.; WYATT, A.; ANENE, N.; ROBINSON-HILL, R.; PICKERILL, E. S.; FOX, N.; GRIFFITH, A.J.; MCKILLIP, J.L.; Using nitrous acid-modified de Man, Rogosa, and Sharpe medium to selectively isolate and culture lactic acid bacteria from dairy foods. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 2, p. 1215-1222, 2020.

REQUE, P.M.; BRANDELLI, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

REZENDE, E. S. V.; LIMA, G. C.; DOS SANTOS LIMA, M.; COELHO, A. S. G.; NAVES, M. M. V. Prebiotic potential of isolated commercial dietary fibres compared to orange albedo in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 28, p. 100-316, 2022.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, S.; RAMOS, I. M.; SESEÑA, S.; POVEDA, J. M., PALOP, M. L. Potential of *Lactobacillus* strains for health-promotion and flavouring of fermented dairy foods. **LWT**, v. 143, p. 102-111, 2021.

ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, 104,915-923, 2007.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-15, 2006.

SAADAT, Y.R.; KHOSROUSHAHI, A.Y.; GARGARI, B.P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. **Carbohydrate polymers**, v. 217, p. 79-89, 2019.

SADRANI, H.; DAVE, J.; RAJIV, B.; VYAS, M. Screening of potential probiotic *Lactobacillus* strains isolated from fermented foods, fruits and of human origin. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, p. 216–225, 2014.

SALVETTI, E.; FONDI, M.; FANI, R.; TORRIANI, S.; FELIS, G. E. Evolution of lactic acid bacteria in the order Lactobacillales as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. **Systematic and applied microbiology**, v. 36, n. 5, p. 291-305, 2013.

SANDERS, M.E; MARCO, M.L. Food formats for effective delivery of probiotics. **Food Science and Technology**, v. 1, p. 65-85, 2010.

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

SOFYAN, A.; IKHSANI A. Y.; PURWANI, E.; HASANAH, L. E. N.; FEBRIYADIN, F. The effect of suweg (*Amorphophallus paeoniifolius*) flour and incubation temperature on characteristics of yogurt with the addition of *Bifidobacterium bifidum* as probiotic. **Materials Today: Proceedings**, 2022

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chem.** Washington, v. 50, n. 8, p. 2432-2438, 2002.

SERRAINO, I.; DUGO, L.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; MAZZON, E.; DUGO, G.; CAPUTI, A. P.; CUZZOCREA, S. Protective effects of cyanidin-3-Oglucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. **Life Sciences**, Amsterdam. v. 73, p. 1097-1114, 2003.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E. Polyphenolic composition of marion and evergreen blackberries. **Journal of food Science**, Davis, v. 69, n. 4, p. 233-240, 2004.

SPAGNOL, C. Aplicação da Liofilização na Obtenção de Microrganismos Viáveis para a Elaboração de logurtes. **Revista Ciências Exatas e Naturais**. v. 7, n. 2, p. 243-253, 2005.

SUI, Y.; LIU, J.; LIU, Y.; WANG, Y.; XIAO, Y.; GAO, B.; ZHU, D. In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus* strains from fermented tangerine vinegar and their cholesterol degradation activity. **Food Bioscience**, v. 39, p. 100-843, 2021.

SURENDRAN, N. M.; AMALARADJOU, M. A.; VENKITANARAYANAN, K. Antivirulence Properties of Probiotics in Combating Microbial Pathogenesis. **Advances in Applied Microbiology**. v. 98, p.1–29, 2017.

TANG, R.; YU, H.; MINGGE, Q.; YUAN, X.; RUAN, Z.; HU, C.; XIAO, M.; XUE, Y.; YAO, Y.; LIU, Q. Biotransformation of citrus fruits phenolic profiles by mixed probiotics in vitro anaerobic fermentation. **LWT**, p. 87-113, 2022.

TIAN, L.; XIONG, D.; JIA, J.; LIU, X.; ZHANG, Y.; DUAN, X. Mechanism study on enhanced emulsifying properties of phosvitin and calcium-binding capacity of its phosphopeptides by lactic acid bacteria fermentation. **LWT**, p. 002-113, 2021.

TODOROV, S. D. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 237-249, 2015.

TURGUT, T.; ÇAKMAKCI, S. Probiotic strawberry yogurts: microbiological, chemical and sensory properties. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 10, n. 1, p. 64-70, 2018.

VENIR, E.; DEL TORRE, M.; STECCHINI, M. L.; MALTINI, E.; DI NARDO, P. Preparation of freeze-dried yoghurt as a space food. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 402-407, 2007.

VERA-PINGITORE, E.; JIMENEZ, M. E.; DALLAGNOL, A.; BELFIORE, C.; FONTANA, C.; FONTANA, P.; WRIGHT, A.; VIGNOLO, G.; PLUMED-FERRER, C. Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. **LWT-Food Science and Technology**, v. 71, n.3, p. 288-294, 2016.

VIEIRA, C. P.; CABRAL C. C.; DA COSTA LIMA, B. R.; PASCHOALIN, V. M. F.; LEANDRO, K. C.; CONTE-JUNIOR, C. A. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MRS47, a potential probiotic strain isolated from kefir grains, increases cis-9, trans-11-CLA and PUFA contents in fermented milk. **Journal of Functional Foods**, v. 31, p. 172-178, 2017.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, p. 895-904, 2003.

VITOLA, H. R. S.; DA SILVA DANNENBERG, G.; DE LIMA MARQUES, J.; LOPES, G. V.; DA SILVA, W. P.; FIORENTINI, Â. M. Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 22-30, 2018.

WANG, S. Y.; LIN, H. S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Jour. of Agric. Food Chem.** Washington, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WANG, S.Y.; JIAO, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. **Jour. of Agr. and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 11, p. 5677-5684, 2000.

WANG, T.; TENG, K.; CAO, Y.; SHI, W.; XUAN, Z.; ZHOU, J.; ZHANG, J.; ZHONG, J. Effects of *Lactobacillus hilgardii* 60TS-2, with or without homofermentative *Lactobacillus plantarum* B90, on the aerobic stability, fermentation quality and microbial community dynamics in sugarcane top silage. **Bioresource Technology**, v. 312, p. 123-600, 2020.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2002.

WEGKAMP, A.; VAN OORSCHOT, W.; DE VOS, W.M.; SMID, E. J. Characterization of the role of para-aminobenzoic acid biosynthesis in folate production by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 2673-2681, 2007.

WESCHENFELDER, S.; PEREIRA, G. D. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 473-480, 2011.

XIAO, L.; XU, D.; TANG, N.; RUI, X.; ZHANG, Q.; CHEN, X.; MINGSHENG, D.; WEI, L. Biosynthesis of exopolysaccharide and structural characterization by *Lactocaseibacillus paracasei* ZY-1 isolated from Tibetan kefir. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, v. 3, p. 54-100, 2021.

YAMAGUCHI, S. K. F.; KREBS, C. S.; BERTOLLI, S. L.; CARVALHO, L. F. Liofilização de produtos lácteos: Uma revisão. **Revista Espacios**, v. 38, p. 1-12, 2017.

YAMAGUCHI, S. K. F.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; DE SOUZA, C. K.; BERTOLI, S. L.; CARVALHO, L. F. D. Evaluation of adding spirulina to freeze-dried yogurts before fermentation and after freeze-drying. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 89-94, 2019.

YAMAGUCHI, S. K. F.; DE SOUZA, C. K.; BERTOLI, S. L.; DE CARVALHO, L. F. Evaluation of physical-chemical and microbiological characteristics of freeze-dried and rehydrated yogurt. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 6, p. 149-446, 2020.

YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 1, p. 124-134, 2019.

YERLIKAYA, O.; SAYGILI, D.; AKPINAR, A. An application of selected enterococci using *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in set-style probiotic yoghurt-like products. **Food Bioscience**, v. 41, p. 96-101, 2021.

ZEPEDA-HERNÁNDEZ, A.; GARCIA-AMEZQUITA, L. E.; REQUENA, T.; GARCÍA-CAYUELA, T. Probiotics, prebiotics, and synbiotics added to dairy products: Uses and applications to manage type 2 diabetes. **Food Research International**, p. 110-208, 2021.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M.; HARRIS, H.; MATTARELLI, P.; TOOLE, P.W.O.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G.E.; GANZLE, M. G.; LABEER, S. 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, p. 2782-2858, 2020.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v.8, p. 473–479, 1998.

Apêndices

Apêndice A- Ficha Análise Sensorial

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Nome:

Idade:

Data:

Você está recebendo duas amostras, codificadas, de leite fermentado suplementado com bactéria probiótica (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) e polpa de amora preta.

A. TESTE DE PREFERÊNCIA

Quanto as duas amostras codificadas recebidas, identifique com um círculo a sua **amostra preferida**.

189

230

Comentários:.....

B. TESTE DE ACEITAÇÃO

Avalie as amostras utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou, de forma **geral/global** de cada amostra.

1 = desgostei muito

2 = desgostei

3 = indiferente

4 = gostei

5 = gostei muito

Amostra

189

230

Nota

Comentários:

.....

Apêndice B- Frutos de amora-preta (*Rubus* sp.) cultivar tupy



Fonte: Embrapa Clima Temperado Pelotas/RS

Apêndice C- Resultado positivo de fermentação de carboidrato frutose pelo isolado H7 *Lactobacillus* sp.; ocorre a mudança de coloração no meio base de cor púrpura para cor alaranjada



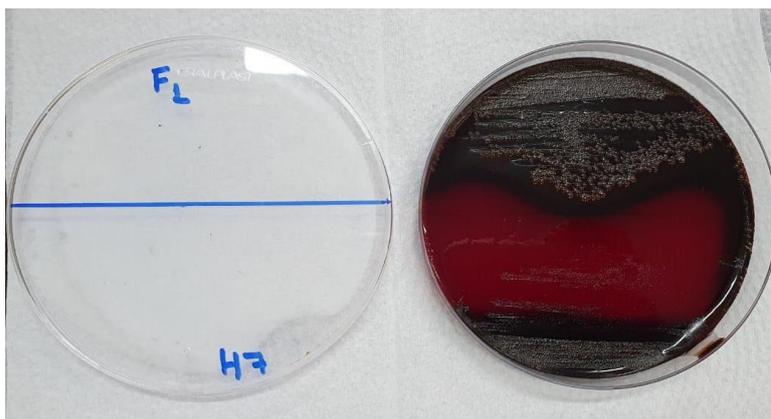
Fonte: O autor

Apêndice D- Teste do Citrato para isolado *Lactobacillus* sp. H7 e *Enterococcus thailandicus* F1; resultado negativo



Fonte: O autor

Apêndice E- Teste de exopolissacarídeos para o isolado *Lactobacillus* sp. H7 e *Enterococcus thailandicus* F1; resultado positivo para o isolado *Lactobacillus* sp.H7



Fonte: O autor

Apêndice F- Leite fermentado suplementando com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta (LF)



Fonte: O autor

Apêndice G- Leite fermentado liofilizado suplementado com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta (LFLR)



Fonte: O autor