



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

RAÍSA LAURA PEREIRA FEITOSA

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM CULTURAS
NATIVAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA USO
EM ALIMENTOS**

**CAMPINA GRANDE
2022**

RAÍSA LAURA PEREIRA FEITOSA

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM CULTURAS
NATIVAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA USO
EM ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Bromatologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti

**CAMPINA GRANDE
2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

F311i Feitosa, Raisa Laura Pereira.

Indução de resistência a condições de estresse em culturas nativas de bactérias lácticas com potencial probiótico para uso em alimentos [manuscrito] / Raisa Laura Pereira Feitosa. - 2022.

43 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

"Orientação : Profa. Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti ,
Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Bactérias lácticas. 2. Culturas nativas probióticas. 3.
Lactiplantibacillus plantarum. 4. Limosilactobacillus mucosae.
5. Lacticaseibacillus rhamnosus. I. Título

21. ed. CDD 615.1

RAÍSA LAURA PEREIRA FEITOSA

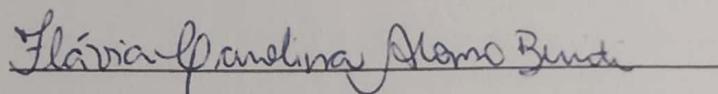
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM CULTURAS
NATIVAS DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PARA USO EM
ALIMENTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

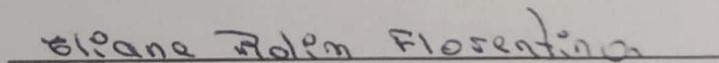
Área de concentração: Bromatologia.

Aprovada em: 09/11/2022.

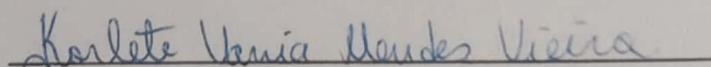
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Flávia Carolina Alonso Buriti (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Eliane Rolim Florentino
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Karlete Vânia de Moraes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Á todos os meus, pela dedicação,
companheirismo e amizade, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Todo o meu bem-querer à Paraíba, estado onde meus avós maternos foram nascidos e criados, lugar que sinto grande conexão e familiaridade. A minha reverência ao ensino público e às políticas de inclusão como ferramentas essenciais para acessibilizar a formação de profissionais humanizados e qualificados. Em especial, à Universidade Estadual da Paraíba, onde tive a honra de poder construir parte da minha trajetória profissional, e também à EREM Luiz Alves da Silva.

À minha orientadora Flávia Carolina Alonso Buriti, pela confiança, responsabilidade e disponibilidade em compartilhar seu tempo e conhecimentos que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho e para minha jornada como profissional.

Aos meus amados pais Edilza, Elpídio, e meu irmão Marcel que sempre me incentivaram aos estudos e fizeram o possível para que eu chegasse até o fim da graduação. Tudo que eu sou é porque vocês vieram antes de guia.

À toda minha família, especialmente Ellyson, Tio Edson, Tia Edímícia.

Thaynara, Samara e Tati (*in memoriam*), pelo afeto e pela fé que sempre me passaram.

Aos meus amigos Anna Júlia, Ana Luísa, Alícia, Dayverson Luan, Genil Dantas, João Victor, Naara Felipe e Viviane Maria. Foi uma felicidade ter encontrado vocês no caminho da graduação.

Aos meus colegas de turma, os dias foram mais leves por vocês dividirem essa jornada comigo.

Às minhas amigas do peito, Kézia Ribeiro e Luana Dias, por todos esses anos de companheirismo e parceria.

Ao meu querido Phylipe por toda fé e apoio, nesse período.

Aos professores do Curso de Farmácia como referência de profissionalismo.

Ao professor Delcio de Castro Felismino, meu primeiro orientador de iniciação científica, por acreditar no meu potencial e incentivar meus primeiros passos na pesquisa, sempre com bom humor e responsabilidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Parque Tecnológico da Paraíba (PaqTcPB), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo financiamento ao projeto. Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pela oportunidade de pesquisa e bolsa. À Dr.^a

Karina Maria Olbrich dos Santos, da Embrapa Agroindústria de Alimentos, pela investigação do potencial probiótico e disponibilização das cepas nativas utilizadas neste estudo.

À toda a equipe do Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA), em especial aos técnicos Elaine, Isanna e Giordanni pela contribuição na pesquisa, conselhos, ensinamentos no laboratório e na vida. Vocês tornaram o cotidiano mais alegre.

Às minhas companheiras de “lab”, Ana Paula, Laura e Vanda.

Aos funcionários da UEPB, especialmente ao secretário Ronald, pela presteza aos atendimentos, amizade e ética.

À assistência estudantil da UEPB, pela garantia de bolsa integral no restaurante universitário durante toda a graduação.

À toda equipe maravilhosa do Restaurante Universitário.

A todos que de alguma forma passaram por mim ao decorrer dessa jornada, vou levar na bagagem as coisas boas e importantes durante minha passagem. Comprometo-me em contribuir firme e com afeto sempre.

RESUMO

As vantagens do consumo de probióticos têm se destacado, tendo em vista os benefícios que estes microrganismos promovem a saúde dos consumidores. A busca por culturas nativas probióticas locais promissoras é importante para possibilitar produtos nutritivos, com menor custo e benéficos para a população. A exposição de microrganismos a condições subletais proporcionam uma resposta adaptativa, tornando-os mais resistentes. Essa estratégia vem a ser interessante na aplicação em probióticos, otimizando seu desenvolvimento em etapas de processamento (calor), variantes na formulação (acidez e osmolaridade), bem como no trato gastrointestinal. Este estudo objetivou determinar a capacidade de sobrevivência das culturas nativas de bactérias lácticas da coleção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em diferentes condições de estresse em caldo MRS, sendo: ácido, ajustado para pH 2,5 e 3,5 com HCl; osmótico, em concentrações de 0 a 18% de NaCl; térmico em MRS tradicional, exposto a temperaturas de 53 e 60 °C. As culturas nativas utilizadas foram *Lactiplantibacillus plantarum* (cepas CNPC001, CNPC002, CNPC003, CNPC004 e CNPC020), *Limosilactobacillus mucosae* (cepa CNPC007) e *Lacticaseibacillus rhamnosus* (cepa EM1107). Após 24 h de cultivo, foi determinada a absorbância em 600 nm. Posteriormente, foi determinada a condição subletal de cada estresse para desafiar as cepas no ensaio de resistência cruzada. Na avaliação de estresse ácido e térmico, as culturas se comportaram de forma semelhante, não havendo multiplicação bacteriana, porém no térmico elas tornaram-se totalmente inviáveis. Tratando da condição de estresse osmótico todas as cepas multiplicaram-se até a concentração de 2 g/mL de NaCl, de forma que as cepas CNPC020, CNPC001 e CNPC004 destacaram-se com a maior viabilidade, multiplicando-se, respectivamente, nas concentrações 8g/mL e 6g/mL de NaCl, tal qual em MRS tradicional. No ensaio de resistência cruzada as cepas CNPC002, CNPC004, CNPC007 e CNPC020 foram destaque dentre as demais, pois multiplicaram-se em maior magnitude em concentrações letais de NaCl, com valores de absorbância de 0,444; 0,943; 1,115 e 0,306, quando comparadas às mesmas cepas que não foram desafiadas, com valores de absorbância iguais a 0,061; 0,137; 0,105 e 0,033, respectivamente. Com o desafio prévio em condições subletais de NaCl, as cepas CNPC001, CNPC002, EM1107 e CNPC020 obtiveram uma maior viabilidade no ambiente de pH 3,5 em relação às demais com valores de absorbância de 1,225; 1,059; 0,584 e maior que 1,5, respectivamente, quando comparadas às mesmas cepas que não foram desafiadas, com valores de absorbância no pH 3,5 iguais a 0,243; 0,160; 0,052 e 0,090, respectivamente. Portanto, a utilização de estresse subletal prévio pode aumentar a sobrevivência de probióticos a condições posteriores de estresse semelhantes, sendo possível obter cepas com maior viabilidade em ambientes adversos de acidez e de alta osmolaridade.

Palavras-chave: bactérias lácticas; culturas nativas probióticas; *Lactiplantibacillus plantarum*; *Limosilactobacillus mucosae*; *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

ABSTRACT

The advantages of probiotic consumption have been highlighted, because of the benefits that such products promote to the health of consumers. The search for promising autochthonous probiotic cultures is important for enabling lower cost, nutritious and beneficial products for the population. The exposure of microorganisms to sublethal conditions provides an adaptive response, making them more resistant. This strategy becomes interesting in the application of probiotics, optimizing their development in processing steps (such as heat), changes in the formulation (such as acidity and osmolarity), as well as in the gastrointestinal tract. This study aimed to determine the survival capacity of native cultures of lactic bacteria from the collection of the Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), under different stress conditions in MRS broth, as follows: acid, adjusted to pH 2.5, and 3.5 with HCl; osmotic, in with concentrations of 0 to 18% of NaCl; thermal in traditional MRS, exposed to 53 °C and 60 °C. The autochthonous cultures used were *Lactiplantibacillus plantarum* (strains CNPC001, CNPC002, CNPC003, CNPC004 and CNPC020), *Limosilactobacillus mucosae* (strain CNPC007) and *Lacticaseibacillus rhamnosus* (strain EM1107). After 24 h of cultivation, the absorbance at 600 nm was determined, choosing the sublethal condition of each stress to challenge the strains in the cross-resistance assay. During the evaluation of acid and heat stress, the cultures behaved in a similar way, with no bacterial growth; however, in the thermal stress, they became totally unviable. Regarding the osmotic stress condition, all strains grew up to a concentration of 2 g/mL of NaCl, so that CNPC020, CNPC001, and CNPC004 stood out with the highest viability, growing, respectively, at concentrations of 8g/mL and 6g/mL NaCl, as in traditional MRS. In the cross-resistance assay, the strains CNPC002, CNPC004, CNPC007, and CNPC020 were highlighted among the others, since they grew more in lethal concentrations of NaCl, with absorbance values of 0.444, 0.943, 1.115, and 0.306, respectively, when compared to the same strains that were not challenged, with absorbance values of 0.061, 0.137, 0.105, and 0.033, respectively. When previously challenged using sublethal conditions of NaCl, the strains CNPC001, CNPC002, EM1107, and CNPC020 obtained higher viability in the environment of pH 3.5, with absorbance values of 1.225, 1.059, 0.584, and higher than 1.5, respectively, when compared to those that were not challenged, where the absorbance values also at pH 3.5 were 0.243, 0.160, 0.052, and 0.090, respectively. Therefore, the use of prior sublethal stress can increase the survival of probiotics in similar stress conditions, making it possible to obtain strains with higher viability under adverse acidic environments and high osmolarity.

Keywords: lactic acid bacteria; autochthonous probiotic cultures, *Lactiplantibacillus plantarum*; *Limosilactobacillus mucosae*; *Lacticaseibacillus rhamnosus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Viabilidade das culturas (log UFC/mL) nas temperaturas 37°; 53 e 60°C no ensaio de estresse térmico	25
Tabela 2 – Viabilidade das culturas (log UFC/mL) de acordo com concentração de NaCl (g/100 mL) Estresse osmótico	27
Tabela 3 – Viabilidade das culturas (log UFC/mL) em pH 5,4; 3,5 e 2,5 - Estresse ácido ..	29
Tabela 4 – Avaliação da resistência cruzada a partir de cepas inicialmente submetidas ao estresse subletal osmótico.....	31
Tabela 5 – Avaliação da resistência cruzada a partir de cepas inicialmente submetidas ao estresse subletal ácido.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS Absorbância

BAL Bactérias láticas

EFSA Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA United States Food and Drug Administration

MRS De Man Rogosa e Sharpe

NUPEA Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos

QPS Presunção Qualificada de Segurança

T0h Tempo de viabilidade inicial

T24h Tempo de viabilidade final

UEPB Universidade Estadual da Paraíba

UFC Unidades formadoras de colônias

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1	Bactérias lácticas e reclassificação do gênero <i>Lactobacillus</i>	14
3.2	Probióticos	15
3.3	Desafios em relação aos fatores que influenciam na viabilidade de probióticos	16
3.4	Biotecnologia	17
3.5	Estresses seletivos e subletais	18
3.5.1	<i>Estresse térmico</i>	19
3.5.2	<i>Estresse osmótico</i>	19
3.5.3	<i>Estresse ácido</i>	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	Condições de cultivo das bactérias lácticas nativas	21
4.2	Determinação da condição subletal de cada estresse	22
4.3	Avaliação da resposta das culturas contra o estresse térmico	23
4.4	Avaliação da resposta das culturas contra o estresse osmótico	23
4.5	Avaliação da resposta das culturas contra o estresse ácido	23
4.6	Avaliação da resistência cruzada	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5.1	Determinação da condição subletal de cada estresse	25
5.1.1	<i>Avaliação da resposta das culturas contra o estresse térmico</i>	25
5.1.2	<i>Avaliação da resposta das culturas contra o estresse osmótico</i>	26
5.2	Avaliação da resposta das culturas contra o estresse ácido	28
5.3	Avaliação da resistência cruzada	30
4	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequadas, conferem efeito benéfico à saúde do hospedeiro" (HILL *et al.*, 2014), as potencialidades dos probióticos têm sido apontadas por autores devido aos benefícios que promovem a saúde dos consumidores ao serem ingeridos em alimentos, como a prevenção de condições, tais quais infecções e distúrbios gastrointestinais, processos alérgicos, carcinogênese e crescimento tumoral (DE LE BLANC; LE BLANC, 2014).

Os produtos comerciais contendo probióticos estão ascendendo comercialmente, tal expansão pode estar relacionada a busca considerável da população sobre questões de saúde e estilo de vida, de forma que o mercado global de probióticos já se consolida, com renomadas empresas trabalhando constantemente no desenvolvimento e comercialização de novos produtos com alegações probióticas (REQUE; BRANDELLI, 2021).

Mesmo havendo uma quantidade significativa de cepas com propriedades probióticas bem caracterizadas e disponíveis comercialmente, a busca por novos microrganismos destinados a benefício da saúde continuam sendo pesquisados (BOTTA *et al.*, 2014; CEBRIAN *et al.*, 2011; TODOROV *et al.*, 2008), tendo em vista que as propriedades probióticas são inerentes a cada cepa, e não necessariamente ligadas apenas ao gênero ou espécie (JANKOVIĆ *et al.*, 2012), torna-se apropriado o estudo e a procura por culturas nativas probióticas locais, que possam vir a ser promissoras no ponto de vista tecnológico e na promoção de saúde, trazendo oportunidades para pequenas indústrias e produtores de possibilitarem produtos com custo menor, nutritivos e benéficos para população (VINDEROLA *et al.*, 2008).

Um dos desafios enfrentados pelos pesquisadores é garantir a integridade dos probióticos nas etapas de fabricação, processamento e armazenamento dos produtos (KOMATSU, BURITI; SAAD, 2008), tendo em vista, a sensibilidade desses microrganismos a diversos aspectos, como a acidez, altas temperaturas e condições elevadas de oxigênio (HUSSAIN *et al.*, 2017; SHAH *et al.*, 2016). Assegurar a viabilidade das cepas probióticas durante o processo de fabricação e as condições inerentes ao trato gastrointestinal é uma tarefa importante, uma vez que segundo dos Santos *et al.* (2015) a maioria de suas ações benéficas ocorrem no ambiente intestinal.

Com o objetivo de melhorar o desempenho dos microrganismos probióticos durante o processamento dos alimentos, muitos pesquisadores têm se dedicado a compreender os mecanismos de resposta ao estresse em lactobacilos e em bifidobactérias. Esses mecanismos de resposta podem ser

conseguidos por exposição dos microrganismos probióticos a condições subletais de estresse, tais como oxigênio, ácido ou calor, o que irá desencadear a resposta adaptativa de suas células ao estresse aplicado e aumentar a sobrevivência quando forem expostas novamente a outras condições letais encontradas no processamento industrial e/ou no trânsito gástrico (TEODORO *et al.*, 2021, p. 5)

Essa estratégia torna-se interessante para a aplicação em probióticos, uma vez que a manutenção da viabilidade desses microrganismos em alimentos e a sua sobrevivência às condições gastrointestinais são ainda desafiadoras. A capacidade de modificar a composição e diversidade da microbiota intestinal, bem como a manutenção de seu equilíbrio, aspectos chaves para a manutenção da imunidade e homeostase do organismo (GÓMEZ-GUZMÁN *et al.*, 2015), são dependentes da sobrevivência dos probióticos às condições adversas gástricas e entéricas.

Estresses subletais induzem a expressão de genes que podem resultar em proteção contra estresses ambientais e gastrointestinais (TERPOU *et al.*, 2019). Segundo Stanton *et al.* (2005), lactobacilos pré-adaptados a condições adversas de sal e calor apresentaram termotolerância mais elevada e maior sobrevivência durante o processo de *spray-drying* quando comparado a culturas que não foram submetidas às condições prévias de estresse. Igualmente, Buriti, Castro e Saad (2010) obtiveram um aumento da sobrevivência da cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* quando incorporados em musses que foram submetidas ao armazenamento congelado (-18°C) em comparação às mousses refrigeradas.

Portanto, a maior capacidade de adaptação às condições ambientais adversas aumenta a probabilidade de sobrevivência do probiótico durante a passagem pelo trato gastrointestinal e as chances de colonização do intestino (TEODORO *et al.*, 2021; TERPOU *et al.*, 2019). Considerando a utilização de bactérias lácticas nativas com potencial probiótico em alimentos, a indução de resistência a múltiplas condições de estresse permitirá a seleção de bactérias mais bem adaptadas a uso em alimentos e com maior capacidade de resultarem em benefícios ao consumidor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de múltiplos estresses sobre a capacidade de sobrevivência de bactérias lácticas nativas com potencial probiótico pertencente à coleção de bactérias lácticas da EMBRAPA.

2.2 Objetivos específicos

Este estudo apresentou os seguintes objetivos específicos:

- a) avaliar a capacidade de sobrevivência de bactérias lácticas em condições ácidas;
- b) avaliar a capacidade de sobrevivência de bactérias lácticas em condições de elevada osmolaridade;
- c) avaliar a capacidade de sobrevivência de bactérias lácticas em condições de elevada temperatura;
- d) verificar a influência do estresse cruzado sobre a capacidade de sobrevivência das bactérias lácticas;
- e) obter bactérias lácticas com maior capacidade de resistência às condições adversas de processamento e armazenamento dos alimentos;
- f) obter bactérias lácticas com maior capacidade de resistência às condições ácidas do estômago;
- g) selecionar as culturas de acordo com o seu ambiente de melhor viabilidade.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Bactérias lácticas e reclassificação do gênero *Lactobacillus*

Bactérias lácticas são gram positivas anaeróbias facultativas ou microaerófilas, em forma de bastonete, não formadoras de esporos (HAYEK; IBRAHIM, 2013). Compõem significativamente a microbiota humana, em vários locais do corpo, como sistema digestivo, sistema urinário e o sistema genital (CAPURSO, 2019).

Até março de 2020 o gênero *Lactobacillus*, da família *Lactobacillaceae*, compreendia 261 espécies extremamente diversas nos níveis fenotípico, ecológico e genotípico, quando então houve uma alteração em sua taxonomia, segundo o estudo de Zheng *et al.* (2020). Naquele estudo, o gênero *Lactobacillus* foi reclassificado em 25 gêneros, incluindo o próprio gênero *Lactobacillus* com manutenção de um número menor de espécies, o gênero *Paralactobacillus* que já existia, o qual agora recebeu a antiga espécie *Lactobacillus selangorensis*, tornando-se *Paralactobacillus selangorensis*, além de 23 novos gêneros, dentre eles *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus* e *Lacticaseibacillus*. A reclassificação proposta pelos autores reflete a posição filogenética dos microrganismos e subdivide os lactobacilos em grupos com propriedades ecológicas e metabólicas compartilhadas.

Em consequência da utilização extensiva na produção alimentícia e na área da saúde várias espécies do antigo e novo gênero *Lactobacillus* são reconhecidas como seguras, tendo sido classificadas como microrganismos de qualidade alimentar pelo *Food and Drug Administration* (FDA), além de atenderem aos critérios de Presunção Qualificada de Segurança (QPS) proposta pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA). Dentre as espécies de *Lactobacillaceae* presentes na lista de bactérias recomendadas para status de QPS (atualizações de março de 2016), estão presentes as espécies *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus mucosae* (ZOTTA; PARENTE; RICCIARDI, 2017).

Grande parte das bactérias lácticas são designadas como probióticos, justamente, por se enquadrarem na definição preconizada pela FAO/WHO (2001), atualizada por Hill *et al.* (2014), visto que ao serem consumidas em quantidades adequadas exercem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Ainda não há um consenso na literatura em relação às quantidades diárias adequadas da ingestão de bactérias probióticas, comumente, quantidades acima de 6 log unidades formadoras de colônias (UFC)/ml ou g, para exercer benefícios no trato gastro intestinal, para outras ações benéficas sistêmicas até $10^8 - 10^{10}$ UFC/dia ou mesmo $10^9 - 10^{10}$

UFC/dose, segundo autores (MARTINEZ, BEDANI; SAAD, 2015; PEREIRA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2020).

3.2 Probióticos

O termo “probiótico” foi descrito por Lilly e Stillwell, nos anos de 1965, relacionado-se a substâncias secretadas por microrganismos capazes de estimular o crescimento de outros (SÁNCHEZ *et al.*, 2017). Esses microrganismos vêm sendo consumidos em alimentos fermentados, desde antiguidade, promovendo saúde. A associação de benefícios relacionados apenas a microbiota intestinal vem modificando-se conforme as pesquisas sobre esse tema ganham destaque.

Tem-se associado a ação sistêmica de probióticos e seu papel no controle e melhoria de diversas doenças (REIS, 2019), estudos mostram ações anti-inflamatórias, principalmente relacionadas à inibição da liberação e saída de citocinas ou ativação de vias pró-inflamatórias (VAN DEN BROEK *et al.*, 2018; ZAGATO *et al.*, 2014), efeitos imunomoduladores, atuando na redução dos níveis de fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas 1 β , 6 e 12 (IL-1 β , IL-6 e IL-12, respectivamente) e aumento nos níveis de interleucina 10 (IL-10) (FENG *et al.*, 2016), ativação do receptor *Toll-like 2* (MANSUR *et al.*, 2014), bem como redutores em fatores de riscos para síndromes metabólicas importantes no controle glicêmico (BORDALO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2020), ademais têm sido apontados por autores como atuantes na prevenção de condições infecciosas e distúrbios gastrointestinais, processos alérgicos, carcinogênese e crescimento tumoral (DE LE BLANC; LE BLANC, 2014; MARTINEZ, BEDANI; SAAD, 2015).

Os gêneros de microrganismos probióticos disponíveis comercialmente são os pertencentes ao antigo e atual gênero *Lactobacillus* (família *Lactobacillaceae*) e também ao gênero *Bifidobacterium*. Sua aplicação em produtos alimentícios para populações saudáveis apresenta uma margem histórica de segurança reconhecida na comunidade científica (BURITI; SAAD, 2014; SAAD *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2020).

Os efeitos atribuídos à saúde com o consumo de alimentos contendo probióticos são vastos, mas para que estes possam vir a promover benefícios aos seus consumidores, é necessário atender diversos critérios, como não perder a viabilidade e função ou promover sabores ou texturas desagradáveis, possuir boas propriedades tecnológicas para que possam ser incorporados em produtos alimentícios; sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal superior, até o seu local de ação; possuir viabilidade para ser capaz de promover benefícios no

ambiente intestinal (DIANAWATI; SHAH, 2011; DING; SHAH, 2009; LIU *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2019; SAARELA *et al.*, 2000).

Tendo em vista que, não há a possibilidade de estabelecimento de quantidade única adequada para todos os produtos (MARTINEZ, BEDANI; SAAD, 2015; SANTOS *et al.*, 2020), e que há a necessidade dessas bactérias probióticas atingirem populações elevadas para promover os benefícios, tanto tecnológicos em termos de produção de produtos alimentícios, como impactar na saúde de seus consumidores, tem sido um desafio para a indústria de alimentos assegurar todas as condições necessárias para produzir produtos probióticos (KOMATSU, BURITI; SAAD, 2008).

3.3 Desafios em relação aos fatores que influenciam na viabilidade de probióticos

Tendo em vista o potencial probiótico em proporcionar saúde para seus consumidores. A sua utilização para finalidades preventivas e terapêuticas tem sido reconhecida de forma atrativa (CREMON *et al.*, 2018). Para isso, faz-se necessário resistirem às condições entéricas, conseqüentemente, aderirem de forma efetiva a mucosa do intestino, dado que grande parte de suas ações benéficas ocorrem no ambiente intestinal (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

Na matriz alimentícia e no ambiente onde está contida, a acidez, concentração de açúcar ou sais, a atividade de água, a produção de peróxido de hidrogênio e de outros metabólitos, a concentração de oxigênio, a temperatura de estocagem, entre outros, são fatores capazes de prejudicar a viabilidade dos probióticos (BURITI; BEDANI; SAAD, 2016; MARTIN *et al.*, 2015). Dessa forma, o microrganismo precisa ser capaz de sobreviver às mais variadas condições de formulação (por exemplo, acidez e osmolaridade), processamento (por exemplo, calor), estocagem (por exemplo, o estresse na presença de oxigênio), assim como à passagem pelo trato gastrointestinal (TERPOU *et al.*, 2019).

A produção, armazenamento e uso de bactérias lácteas, como os probióticos, impõem estresse ambiental nas células bacterianas. Principalmente, durante a fermentação industrial, onde se encontra uma série de condições de estresse, como baixa temperatura, baixo pH e baixa atividade de água (MURUZOVIC; MLADENOVIC; COMIC, 2018). As variações nas condições de formulação representam desafios, visto que esses microrganismos possuem sensibilidade a temperatura elevada, prática de inoculação, acidez, oxigênio e interações de espécies (GALLINA *et al.*, 2011; STANTON *et al.*, 2005), tais condições são comuns dentro da produção alimentícia. A viabilidade e efetividade deve ser estudada e confirmada em cada

cepa ou para o produto comercializado (VANDENPLAS; HUYS; DAUBEC, 2015), sendo assim cada cepa possui propriedades particulares.

Faz-se necessário que alimentos probióticos possuam linhagens de microrganismos capazes de manter níveis adequados de células com viabilidade, sem interferência em texturas e sabores, pelo período de armazenamento (GALLINA *et al.*, 2012), bem como no processo de produção. Nesse sentido, estudos voltados para utilização de biotecnologia como ferramenta para melhoramento da viabilidade de bactérias probióticas (AHMED, 2003; DOUILLARD; DE VOS, 2019; STANTON *et al.*, 2005) pode ser uma alternativa para obtenção de cepas mais resistentes.

3.4 Biotecnologia

Foi preconizada a primeira vez em 1919 pelo engenheiro húngaro Karl Ereky, referindo-se a biotecnologia como “todas as linhas de trabalho, cujos produtos eram produzidos a partir de matéria bruta com auxílio de organismos vivos” (STEINBERG, 2002).

Alternativas biotecnológicas, como a "biotecnologia tradicional" utiliza de métodos de melhoramento genético, como mutagênese e a conjugação para viabilizar melhorias em microorganismo, para fins de utilização no processamento de produtos alimentícios (TEODORO, *et al.*, 2021). Essas estratégias, requerem uma abordagem multidimensional, pois dizem respeito a fatores bióticos e abióticos (ISENRING *et al.*, 2021).

De encontro com a tecnologia de DNA recombinante, técnicas de engenharia de bioprocessos representam uma vantagem na aceitação da população por serem visto como um processo mais natural, pode ser uma alternativa a aplicação em alimentos, de acordo com Çakar *et al.* (2005), como por exemplo a engenharia evolutiva ou engenharia adaptativa.

Uma solução promissora para a melhoria de microorganismos é a engenharia evolutiva, que orienta a multiplicação contínua de microorganismos exercendo uma condição de adversidades de cultivo por meio de estresse seletivos, levando ao aumento de características desejáveis (PÉREZ-TORRADO; QUEROL; GUILLAMÓN, 2015; WANG *et al.*, 2019). Algumas centenas de gerações posteriores do microorganismo submetido ao estresse, mutantes haplóides são obtidos, os quais apresentam vários rearranjos cromossômicos, podendo estes novos microorganismos serem isolados e avaliados quanto ao seu metabolismo (SANTOS; GELINSKI; 2008; TEODORO *et al.*, 2021). A viabilidade desse método é interessante, visto que o tempo de multiplicação de microorganismos são curtos,

facilitando o surgimento rápido de cepas seletivas (BACHMANN *et al.*, 2015; ÇAKAR, 2012; MANS; DARAN; PRONK, 2018; WINKLER; KAO, 2014).

É uma abordagem bem estabelecida para melhorar as características de cepas alvo (ISENRING, *et al.*, 2021), como exemplo de características fenotípicas de interesse destacam-se: maior eficiência fermentativa e geração de produtos, uma maior resistência a condições de alta ou baixas temperaturas, congelamento-descongelamento, estresse oxidativo e osmótico, bem como maior conteúdo de produtos intermediário e final metabólicos (TEODORO, *et al.*, 2021).

3.5 Estresses seletivos e subletais

Estresses ambientais são atribuídos como responsáveis por causarem danos, injúrias ou mesmo a morte celular de bactérias (CORCORAN *et al.*, 2008), no entanto tratamentos com estresses subletais químicos ou físicos, que não levem a morte celular, mas sim conduzam esses microrganismos a adaptação e sobrevivência (NGUYEN *et al.*, 2016), podem ser uma ferramenta para induzir o melhoramento de cepas probióticas.

Mecanismos de respostas a estresses de microrganismos é sugerido por Terpou *et al.* (2019) onde a exposição em níveis subletais de estresse, em condições de calor, oxigênio acidez, proporciona uma resposta de adaptação a células bacterianas ao estresse aplicado, consequentemente o aumento da sua viabilidade a exposição de estresse letais semelhantes, que são recorrentes no processamento de indústria ou trânsito gástrico, os autores ainda relatam que estresses subletais levam a expressão gênica, resultando em níveis satisfatórios de proteção contra os estresses ambientais e gastrintestinais (TERPOU *et al.*, 2019).

A aplicação dessas estratégias, permitem que as bactérias probióticas desenvolvam respostas adaptativas ao estresse, levando a um aumento em sua sobrevivência em comparação com aquelas que são diretamente deslocadas para a mesma condição de estresse letal (SAARELA *et al.*, 2004). A resposta dos probióticos depende da expressão diferencial de genes associados, sendo essa expressão regida pela natureza, amplitude e frequência do estresse aplicado (NGUYEN *et al.*, 2016).

Quando Ma *et al.* (2021) relatam que a pré-adaptação a tratamentos subletais, como estresse oxidativo, ácido, sal biliar e osmótico, também pode aumentar a tolerância ao calor na cultura de bactérias lácticas, é sugestivo que a ação de um estresse pode impactar na adaptação de um outro.

Segundo Tan *et al.* (2022), algumas respostas aos estresses podem ser de longa duração, enquanto que outras são de curta duração. Estes mecanismos normalmente ocorrem por mutações, podendo ser hereditários, passando para algumas gerações de microrganismos, sendo que para as respostas de curta duração, em algum momento, novas gerações deixarão de desenvolver tal característica. Especificamente para estas adaptações de curta duração aos estresses, tais respostas podem ocorrer por modificações epigenéticas (TAN *et al.*, 2022), as quais são definidas como modificações hereditárias no DNA sem afetar a sua sequência de nucleotídeos (PULIDOS FONTES; QUESADA JIMENEZ; MENDIOROZ IRIARTE, 2015). Mecanismos epigenéticos também são capazes de permitir que os microrganismos desenvolvam respostas de resistência contra estresses cruzados (TAN *et al.*, 2022).

3.5.1 Estresse térmico

O efeito de temperaturas severas, não letais, em bactérias as conduzem a uma reprogramação celular e metabólica, em resposta às mudanças em sua temperatura ambiental (DESMOND *et al.*, 2002).

Evidências da utilização de estresses subletais térmicos em microrganismo sugerem aumento na viabilidade ou resistência a temperaturas elevadas a partir de uma pré-exposição térmica, como os estudos conduzidos por De Angelis e Gobbetti (2004), onde a taxa de sobrevivência de algumas cepas de espécies de *Lactobacillus* aumentou de 10 a 1000 vezes em temperaturas letais, quando expostas previamente na fase exponencial a temperaturas subletais, ademais a pesquisa realizada por Nguyen, *et al.* (2014), demonstrou a adaptação da cepa *Bifidobacterium bifidum* THT0101, exposta a temperaturas subletais, resultou em um aumento significativo da resistência das células ao congelamento.

3.5.2 Estresse osmótico

As bactérias lácticas na produção alimentícia, são expostas ao estresse osmótico quando adiciona-se elevadas quantidades de sal ou açúcar ao produto. De forma que elas necessitam adaptar-se a esses ambientes hostis para continuarem viáveis (TERPOU *et al.*, 2019). A resposta ao estresse osmótico relaciona-se ao acúmulo de solutos compatíveis e ativação de proteínas associadas à membrana para manter a pressão de turgescência da célula (SERRAZANETTI *et al.*, 2009).

O estudo de Hidalgo-Cantabrana *et al.* (2014), relata que a viabilidade probiótica foi 0,83 log (UFC/g) maior em comparação com as células não estressadas. O cloreto de sódio é frequentemente usado para induzir estresse osmótico em probióticos, seu efeito tem sido relatado em estudos (NGUYEN *et al.*, 2016). Como descrito por Prasad; Mcjarrow e Gopal, (2003), onde a cepa de *Lacticaseibacillus rhamnosus* HN001 (anteriormente *Lactobacillus rhamnosus* HN001), respondeu bem em termos de viabilidade no armazenamento a 30 °C após pré-estresse com NaCl 0,6 M. Ademais, lactobacilos pré adaptados a condições de adversidade de sal e temperatura, responderam com elevação da termotolerância e aumento em sobrevivência em *spray-drying*, quando comparadas às culturas não submetidas ao processo adaptativo (STANTON *et al.*, 2005).

3.5.3 Estresse ácido

Dentre os diversos estresses presentes no ambiente, o estresse ácido é um desafio considerável no contexto de sobrevivência de microrganismo, a tolerância a ambientes ácidos é um dos critérios importantes de seleção de potenciais probióticos (WU; HUANG; ZHOU, 2015).

Os microrganismos evoluíram e desenvolveram diversos mecanismos para manter o pH em homeostase (HE *et al.*, 2017; JAIN *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2016; LU *et al.* 2013; MILLER; MAIER 2014; SOHLENKAMP, 2017). O pH é um parâmetro de suma importância para o crescimento e metabolismo celular, relaciona a forma de utilização de proteínas, degradação de substratos e síntese proteica, como ácidos nucleicos (GUAN *et al.* 2013).

Alguns autores relatam que a adaptação ao baixo pH permitiu que as bactérias melhorassem sua resistência a condições ácidas letais (PHADTARE *et al.*, 1999; SÁNCHEZ *et al.*, 2007; ŠEME *et al.*, 2015). Os estudos de Mathipa e Thantsha (2015), que utilizou-se de estresses em baixo pH e sais biliares, resultou que as células bacterianas sobreviventes pré-expostas a esses estresses aumentaram a resistência ao serem avaliadas em condições de simulação gastrointestinal.

Ainda se faz necessário estudos que esclareçam as lacunas existentes no quesito de utilização de pré-estresses, estresses subletais e estresses cruzados, lacunas como essas impulsionam estudos como esse trabalho, propostos a avaliar a capacidade de sobrevivência de bactérias lácteas frente a diferentes tipos de estresses.

4 METODOLOGIA

4.1 Condições de cultivo das bactérias lácticas nativas

Foram utilizadas as seguintes culturas nativas de lactobacilos pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa no presente trabalho: *Lacticaseibacillus rhamnosus* EM1107, *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC001, CNPC002, CNPC003, CNPC004, CNPC020 e *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007. As cepas, disponibilizadas na forma liofilizada, foram cultivadas em 5 mL de caldo de Man Rogosa e Sharpe (MRS) a 35 ± 2 °C por 24 horas. Foram obtidas as absorvâncias das culturas no comprimento de onda de 600 nm, sendo padronizadas as culturas em absorvância igual a 1,0 para uso nos ensaios do trabalho. De acordo com a turvação apresentada no ensaio, as amostras foram selecionadas para plaqueamento com a finalidade de se obter as curvas de multiplicação de cada um dos microrganismos avaliados e respectivas equações representativas de suas concentrações (log UFC/ml) em função da absorvância em 600 nm. Desta forma, foram construídas curvas de calibração das culturas usando caldo MRS com a absorvância determinada paralelo ao de plaqueamento em ágar para a determinação das unidades formadoras de colônias (UFC/ml) para este fim, diluições decimais seriadas foram preparadas em MRS a partir de 1 ml de amostra coletada. Alíquotas de 1 ml das diluições foram transferidas, respectivamente, para a superfície em ágar MRS a 37 °C por 48 h para a determinação das unidades formadoras de colônias.

As equações obtidas para cada microrganismo estão listadas a seguir, a partir da construção das curvas de calibração das culturas paralelo ao de plaqueamento em ágar para a determinação das unidades formadoras de colônias (UFC/ml):

Lactiplantibacillus plantarum CNPC001, calculado segundo a equação (1):

$$C = (47800000 \times (ABS_{600nm})) + (-23200000) \quad (1)$$

Lactiplantibacillus plantarum CNPC002, calculado segundo a equação (2):

$$C = (82700000 \times (ABS_{600nm})) + (-6500000) \quad (2)$$

Lactiplantibacillus plantarum CNPC003, calculado segundo a equação (3):

$$C = (77500000 \times (ABS_{600nm})) + (-5920000) \quad (3)$$

Lactiplantibacillus plantarum CNPC004, calculado segundo a equação (4):

$$C = (70600000 \times (ABS_{600nm})) + (-5250000) \quad (4)$$

Lactiplantibacillus plantarum CNPC020, calculado segundo a equação (5):

$$C = (155000000 \times (ABS_{600nm})) + (-14800000) \quad (5)$$

Limosilactobacillus mucosae CNPC007, calculado segundo a equação (6):

$$C = (297000000 \times (ABS_{600nm})) + (-24100000) \quad (6)$$

Lactocaseibacillus rhamnosus EM1107, calculado segundo a equação (7):

$$C = (90200000 \times (ABS_{600nm})) + (-10100000) \quad (7)$$

Onde C é a concentração do microrganismo na amostra (UFC/g) e (ABS_{600nm}) é o valor de absorvância obtido para amostra em 600 nm. Os valores obtidos em UFC/g foram, na sequência, convertidos para log UFC/g.

Os ensaios de resistência aos estresses ácido, térmico e osmótico foram conduzidos com base no estudo de Kim *et al.* (2001), com as adaptações descritas a seguir.

4.2 Determinação da condição subletal de cada estresse

Para a avaliação do efeito da acidez, as culturas foram cultivadas em caldo MRS ajustado para pH 2,5 e 3,5 com ácido clorídrico diluído a 1 M. O caldo foi inoculado com as culturas a uma absorvância inicial igual a 0,1 durante 24 horas. As amostras foram coletadas no tempo 0 e após 24 horas e serialmente diluídas em caldo MRS estéril para a determinação das unidades formadoras de colônias por absorvância a 600 nm utilizando a curva de calibração pré-determinada.

Para a avaliação do estresse térmico, as culturas em caldo MRS com absorvância inicial igual a 0,1 foram incubadas às temperaturas de 37, 53 e 60 °C durante 24 horas. Após o tempo de incubação as amostras foram coletadas para a determinação das unidades formadoras de colônias utilizando a curva de calibração pré-determinada.

Para a avaliação do estresse osmótico, foram utilizados caldo MRS contendo 0-18% de cloreto de sódio. Estes foram inoculados a uma absorvância inicial de 0,1 em 600 nm e incubados por 24 h a 37 °C. Após o tempo de incubação as amostras foram coletadas para a

determinação das unidades formadoras de colônias, e log UFC/mL utilizando a curva de calibração pré-determinada.

4.3 Avaliação da resposta das culturas contra o estresse térmico

Cultivos de 5 ml de cada culturas foram preparados. De forma que cada cultura foi incubada a 37 °C (controle), desafiada 53 °C e 60 °C (condição de estresse térmico) por 24 horas. As unidades formadoras de colônias foram determinadas por absorbância a 600 nm no tempo 0 h e 24 horas de cada ensaio.

4.4 Avaliação da resposta das culturas contra o estresse osmótico

Cultivos de 5 ml de cada culturas foram preparados. Uma fase log foi suspensa em caldo MRS contendo de 2-18% de cloreto de sódio (teste osmótico). As amostras foram incubadas a 37 °C por 24 horas. As absorbâncias a 600 nm foram determinadas para obtenção das unidades formadoras de colônias.

4.5 Avaliação da resposta das culturas contra o estresse ácido

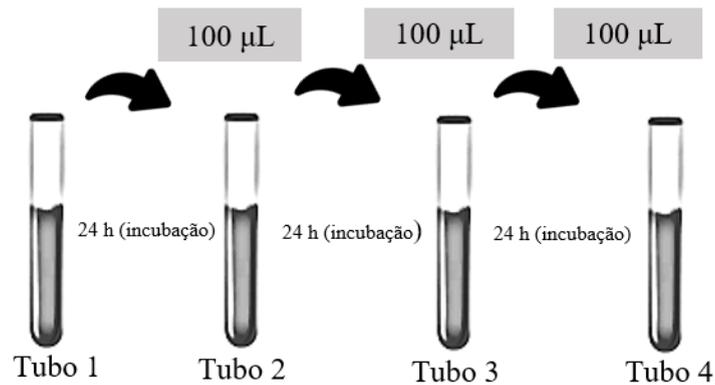
Cultivos de 5 ml de cada culturas foram preparados em MRS tradicional. Uma fase log foi suspensa em caldo MRS tradicional (controle) e a outra em caldo MRS contendo ácido clorídrico, pH 3,5 e 2,5 (teste ácido). As amostras foram incubadas por 24 horas. As absorbâncias a 600 nm foram determinadas no tempo zero e após as 24 horas de incubação e consequentemente transformadas UFC/mL.

4.6 Avaliação da resistência cruzada

Os ensaios de resistência aos estresses ácido, térmico e osmótico foram conduzidos com base no estudo de Kim *et al.* (2001), com adaptações. Cultivos de cada cultura foram previamente expostos ao nível subletal de cada estresse. As culturas que foram pré-expostas ao estresse subletal ácido foram recuperadas em MRS tradicional, em seguida expostas tanto ao estresse térmico como ao estresse osmótico. Do mesmo modo, as culturas pré-expostas ao estresse subletal térmico foram recuperadas em MRS tradicional e expostas aos estresses subletais ácido e osmótico. Igualmente, as culturas pré-expostas ao estresse osmótico foram

recuperadas em MRS tradicional e expostas aos estresses ácido e térmico. O esquema das etapas de cultivo para estresse cruzado investigadas neste estudo é apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Etapas de cultivo para ensaio de resistência cruzada.



Fonte: autoria própria.

Legenda: Tubo 1: cultivo-Mãe da cepa em MRS tradicional. Tubo 2: cultivo em MRS ajustado à condição subletal ácida, osmótica ou térmica. Tubo 3: cultivo para recuperação da cepa em MRS tradicional. Tubo 4: cultivo em MRS condição letal de estresse ou bacteriostática (ácida, osmótica e térmica).

Conforme a Figura 1, a ordem de cultivo se dava da seguinte forma:

- iniciando por cultivo em estresse subletal osmótico o estresse final aplicado seria o letal ou bacteriostático ácido e térmico;
- iniciando por cultivo em estresse subletal ácido o estresse final aplicado seria o letal ou bacteriostático osmótico e térmico;
- iniciando por cultivo em estresse subletal térmico o estresse final aplicado seria o letal ou bacteriostático ácido e osmótico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação da condição subletal de cada estresse

5.1.1 Avaliação da resposta das culturas contra o estresse térmico

Os resultados em log UFC/mL do tempo 0 h (t_{0h}) na temperatura ótima de 37 °C em relação aos valores obtidos em log UFC/mL no tempo de incubação de 24 horas (t_{24h}) nas temperaturas do estresse térmico (Tabela 1) foram bastante semelhantes, verificou-se que as culturas nativas não apresentaram multiplicação, de forma que o valor em log UFC/mL t_{24h} nas temperaturas do ensaio corresponde, provavelmente, ao inóculo. Sendo assim, não houve multiplicação celular devido aos danos causados pelas temperaturas elevadas. As culturas avaliadas apresentaram-se termossensíveis às temperaturas entre 53 °C e 60 °C, reforçando que as bactérias lácticas (BAL) são vulneráveis ao calor, tal qual o estudo realizado por Gardiner *et al.* (2000), onde a cepa *Ligilactobacillus salivarius* UCC 118 (anteriormente *Lactobacillus salivarius* UCC 118) apresentou um tempo de redução decimal de 1,1 min a 59 °C ($D_{59\text{ °C}} = 1,1\text{ min}$).

Tabela 1 – Viabilidade das culturas (log UFC/mL) nas temperaturas 37, 53 e 60 °C no ensaio de estresse térmico

Cultura	Log			Log			Log		
	ABS t_{0h}	UFC/mL t_{0h}	ABS t_{24h} 37°C	UFC/mL t_{24h} 37°C	ABS 53°C	UFC/mL t_{24h} 53°C	ABS 60°C	UFC/mL t_{24h} 60°C	
CNPC001	0,142	6,65	1,653	> 8,28	0,093	6,33	0,083	6,83	
CNPC002	0,112	6,44	1,639	>8,50	0,106	6,36	0,022	<6,03	
CNPC003	0,115	6,48	1,615	>8,48	0,091	6,05	0,072	<6,00	
CNPC004	0,133	6,62	1,642	>8,06	0,110	6,40	0,106	6,35	
CNPC007	0,154	7,33	1,647	>9,08	0,097	6,67	0,150	7,31	
CNPC020	0,085	<6,30	1,071	8,18	0,085	<6,30	0,079	<6,30	
EM1107	0,130	6,20	1,580	>8,12	0,079	<6,12	0,133	6,28	

Símbolos: CNPC001 *L. plantarum* CNPC001; CNPC002 *L. plantarum* CNPC002; CNPC003 *L. plantarum* CNPC003; CNPC004 *L. plantarum* CNPC004; CNPC007 *L. mucosae* CNPC007; CNPC020 *L. plantarum* CNPC020; EM1107 *L. rhamnosus* EM1107; ABS Absorbância; > limite máximo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida e equação da reta utilizada para a conversão em UFC/mL e, posteriormente, log UFC/mL; < limite mínimo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida e equação da reta utilizada para a conversão em UFC/mL e, posteriormente, log UFC/mL

Todas as cepas expostas ao ensaio térmico foram recultivadas em MRS tradicional, na temperatura de 37 °C, para definir se as temperaturas de estresse atuaram de forma bactericida

ou bacteriostática, mas nenhum cultivo apresentou multiplicação. Portanto, não foi viável definir temperatura subletal para prosseguir o ensaio de resistência cruzada. Faz-se necessário mais estudos para esclarecimento da viabilidade térmica das culturas nativas.

5.1.2 Avaliação da resposta das culturas contra o estresse osmótico

No estresse osmótico as culturas foram cultivadas em diferentes concentrações de NaCl, de forma que o log de UFC/mL de cada concentração foi determinado conforme a Tabela 2. Um dos critérios utilizados para escolha da condição subletal foi a maior concentração de NaCl, na qual o nível de células ainda estava apresentando multiplicação de forma lenta e/ou a maior concentração na qual após exposição em ambiente estressor, a cepa em questão não tornava-se inviabilizada após cultivo em MRS tradicional. Sendo assim as concentrações escolhidas para dar seguimento ao ensaio de resistência cruzada foram os indicados conforme a Tabela 2.

As cepas *L. plantarum* CNPC020, CNPC001 e CNPC004, apresentaram a maior resistência osmótica (Tabela 2), sendo respectivamente 8 g/mL e 6 g/mL de NaCl, o valor correspondente em absorbância nessas concentrações ultrapassaram o limite máximo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida através da equação da reta.

Tabela 2 – Viabilidade das culturas (log UFC/mL) de acordo com concentração de NaCl (g/100 mL) no ensaio de estresse osmótico

Concen- tração Nacl (g/ml)	CNPC001		CNPC002		CNPC003		CNPC004		CNPC007		CNPC020		EM1107	
	ABS	Log UFC/mL	ABS	Log UFC/mL	ABS	Log UFC/mL	ABS	Log UFC/mL	ABS	Log UFC/mL	ABS	Log UFC/mL	ABS	Log UFC/mL
0	1,619	> 7,80	>1,5	> 8,03	>1,5	> 8,00	>1,5	> 8,06	>1,5	> 9,8	>1,277	>8,12	>1,370	> 8,12
2	1,615	> 7,80	>1,5	>8,03	>1,5	> 8,00	>1,5	> 8,06	>1,5	> 9,8	>1,277	>8,12	>1,370	> 8,12
4	1,636	> 7,80	1,162	7,95	1,171	7,93	>1,5	> 8,06	1,428	8,60	>1,277	>8,12	>1,370	> 8,12
6	1,486	> 7,80	0,122	6,56	0,291	7,22	>1,5	> 8,06	1,252	8,54	>1,277	>8,12	1,337	8,04
8	0,923	7,72	0,077	<6,03	0,182	6,91	1,381	7,92	0,748	8,30	>1,277	>8,12	1,249	8,01
10	0,930	7,72*	0,064	< 6,03	0,169	6,86	0,311	7,22*	0,110	6,93	0,210	7,25*	0,830	7,81
12	-0,071	< 5,80	0,061	< 6,03	0,180	6,90*	0,137	6,65	0,095	6,61	0,033	< 6,12	0,211	6,95*
14	-0,120	< 5,80	0,086	<6,03*	0,127	6,59	0,112	6,42	0,118	7,04	0,038	< 6,12	0,088	6,12
16	-0,109	< 5,80	0,085	<6,03	0,113	6,45	0,102	6,29	0,092	6,51*	0,038	< 6,12	0,130	6,21
18	-0,094	< 5,80	0,103	<6,30	0,087	5,92	0,172	6,41	0,105	6,85	0,078	< 6,12	0,118	5,74

Símbolos: CNPC001 *L. plantarum* CNPC001; CNPC002 *L. plantarum* CNPC002; CNPC003 *L. plantarum* CNPC003; CNPC004 *L. plantarum* CNPC004; CNPC007 *L. mucosae* CNPC007; CNPC020 *L. plantarum* CNPC020; EM1107 *L. rhamnosus* EM1107; ABS Absorbância; * condição subletal obtida; > limite máximo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida e equação da reta utilizada para a conversão em UFC/mL e, posteriormente, log UFC/mL; < limite mínimo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida e equação da reta utilizada para a conversão em UFC/mL e, posteriormente, log UFC/mL.

A espécie *L. plantarum* é notoriamente conhecida devido sua capacidade de resistência a condições de alta osmolaridade, devido a esse atributo, possuem capacidade de fermentar alimentos com alta concentração de sal (0,5 e 10%) (CHAMKHA *et al.*, 2008; MILESI *et al.*, 2008; GÓMEZ-RUIZ *et al.*, 2008). As cepas que apresentaram uma maior viabilidade no ensaio de estresse osmótico foram justamente as pertencentes à espécie *L. plantarum*, em especial, CNPC020, CNPC001 e CNPC004, multiplicando-se respectivamente nas concentrações 8 g/mL e 6 g/mL de NaCl, tal qual em MRS tradicional. As cepas CNPC007 e EM1107 obtiveram uma viabilidade acima de 8 log UFC/mL. A exposição à alta concentração de NaCl não foi capaz de inviabilizar as células, de modo que a resistência osmótica podem torná-las mais favoráveis para possível incorporação em alimentos com alto teor de sal, como queijos e alimentos curados ou açúcar, como geleias e sucos.

Os valores destacados na tabela em negrito com asterisco são correspondentes ao valor em absorbância da condição subletal obtida, sendo esta a maior concentração de NaCl com multiplicação de microrganismos de forma lenta e/ou a maior concentração que a cepa em questão não se tornava inviabilizada após recultivo em MRS tradicional. Dessa forma, a concentração subletal das cepas CNPC001, CNPC004 e CNPC020 corresponde a 10 g/ml de NaCl; CNPC003 e EM1107 a 12 g/ml de NaCl; CNPC002 14 g/ml de NaCl e CNPC007 de 16 g/ml de NaCl, sendo esta a cepa capaz de permanecer viável à maior concentração de NaCl, em relação às demais, após ser recultivada em MRS tradicional.

5.2 Avaliação da resposta das culturas contra o estresse ácido

Quando comparados os resultados em log UFC/mL (Tabela 3) dos cultivos em MRS sem acidificação (log UFC/mL t_{0h} pH 6,4) e aqueles que passaram pelo desafio de estresse ácido (log UFC/mL t_{24h} pH 3,5 e log UFC/mL t_{24h} pH 2,5), as culturas comportaram-se de forma semelhante. Em função dessa semelhança, a população microbiana obtida demonstra tratar-se apenas do valor referente ao inóculo e não de multiplicação bacteriana.

Dessa forma, é necessário mais estudos para poder definir o pH subletal de cada cultura. Todas as cepas foram submetidas ao desafio ácido nos dois pHs avaliados, e posteriormente recultivadas em MRS sem acidificação, dessa forma *L. plantarum* CNPC003 e CNPC004, assim como *L. mucosae* CNPC007, foram as cepas que conseguiram se recuperar em MRS tradicional após o pré-cultivo em pH 2,5. Por consequência, o pH escolhido para dar seguimento ao ensaio de resistência cruzada dessas cepas foi 2,5 e para as demais pH 3,5.

Tabela 3 – Viabilidade das culturas (log UFC/mL) em pH 6,4; 3,5 e 2,5 - estresse ácido

Cultura	ABS t _{0h} pH 6,4	log UFC/mL t _{0h} pH 6,4	ABS t _{24h} pH 6,4	log UFC/mL t _{24h} pH 6,4	ABS t _{0h} pH 3,5	log UFC/mL t _{0h} pH 3,5	ABS t _{24h} pH 3,5	log UFC/mL t _{24h} pH 3,5	ABS t _{0h} pH 2,5	log UFC/mL T _{0h} pH 2,5	ABS t _{24h} pH 2,5	log UFC/mL t _{24h} pH pH 2,5
CNPC001	0,126	6,57	>1,5	>8,28	0,149	6,68	0,243	6,97	0,177	6,79	0,197	6,85
CNPC002	0,132	6,65	>1,5	>8,50	0,139	6,70	0,160	6,83	0,160	6,83	0,202	7,01
CNPC003	0,136	6,66	>1,5	>8,48	0,146	6,73	0,356	7,34	0,174	6,88	0,212	7,02
CNPC004	0,116	6,47	>1,5	>8,06	0,139	6,66	0,148	6,72	0,164	6,80	0,188	6,90
CNPC007	0,151	5,32	>1,5	>9,08	0,149	5,30	0,166	5,40	0,145	5,28	0,170	5,42
CNPC020	0,050	6,30	>1,5	> 8,30	0,067	6,30	0,090	6,30	0,081	6,30	0,106	6,21
EM1107	0,054	6,12	>1,5	>8,12	0,580	<6,12	0,052	< 6,12	0,067	<6,12	0,093	< 6,12

Símbolos: CNPC001 *L. plantarum* CNPC001; CNPC002 *L. plantarum* CNPC002; CNPC003 *L. plantarum* CNPC003; CNPC004 *L. plantarum* CNPC004; CNPC007 *L. mucosae* CNPC007; CNPC020 *L. plantarum* CNPC020; EM1107 *L. rhamnosus* EM1107; ABS Absorbância; > Limite máximo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida e equação da reta utilizada para a conversão em UFC/mL e, posteriormente, log UFC/mL; < Limite mínimo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida e equação da reta utilizada para a conversão em UFC/mL e, posteriormente, log UFC/mL.

5.3 Avaliação da resistência cruzada

Os produtos alimentícios representam a forma mais popular de consumo de probióticos, a viabilidade de bactérias na matriz alimentar contra diferentes parâmetros inadequados durante o desenvolvimento, processamento e armazenamento do produto é específica da cepa (TRIPATHI; GIRI, 2014). Condições de estresse controlado podem ser aplicadas com o intuito de aumentar a capacidade de sobrevivência das culturas probióticas, como por exemplo o melhoramento genético por meio de estresse subletal, de forma que a exposição de microrganismo a condições de estresse, induz a uma adaptação, de forma que tornam-se menos susceptíveis quando expostas a condições semelhantes posteriormente (TEODORO *et al.*, 2021).

Todas as cepas foram submetidas ao estresse subletal osmótico – viabilidade final (t_{24h}) obtida em MRS-NaCl – permaneceram viáveis após recultivo em MRS tradicional – viabilidade final (t_{24h}) após recuperação em MRS (log/UFC mL) – como pode ser observado na Tabela 4. De forma que, os valores em absorbância ultrapassaram o limite máximo de detecção da concentração de microrganismos, indicando alta multiplicação celular, tais valores foram convertidos em UFC/mL e, posteriormente, em log UFC/mL.

A resposta das cepas *L. plantarum* CNPC003 e CNPC004, bem como *L. mucosae* CNPC007, no ensaio de resistência cruzada, onde inicialmente tais culturas foram submetidas ao estresse subletal osmótico (Tabela 4), não apresentou diferença significativa quando comparadas aos ensaios isolados de estresse ácido, de forma que os valores em log/UFC mL após 24 horas de incubação, em ambos os ensaios foram semelhantes, correspondendo provavelmente apenas ao inóculo, tratando-se de microrganismos, algumas cepas expressam proteínas de resposta ao estresse (FERREIRA, 2011), outras não.

Tabela 4 – Avaliação da resistência cruzada a partir de cepas inicialmente submetidas ao estresse subletal osmótico

Cultura	Concentração subletal de NaCl usada no MRS (g/mL)	Viabilidade inicial (t0h) em MRS-NaCl		Viabilidade final (t24h) obtida em MRS-NaCl		Viabilidade inicial (t0h) após recuperação em MRS		Viabilidade final (t24h) após recuperação em MRS		pH letal usado para avaliação da resistência cruzada ao estresse	Viabilidade inicial (t0h) em MRS acidificado		Viabilidade final (t24h) em MRS acidificado	
	NaCl (g/mL)	ABS	log UFC/mL	ABS	log UFC/mL	ABS	log UFC/mL	ABS	log UFC/mL	pH	ABS	log UFC/mL	ABS	log UFC/mL
CNPC001	10	0,094	6,34	0,102	6,41	0,041	5,80	>1,5	>8,28	3,5	0,144	6,66	*1,225	7,75
CNPC002	14	0,141	6,71	0,123	6,56	0,010	<6,03	>1,5	>8,50	3,5	0,145	6,59	*1,059	7,91
CNPC003	12	0,101	6,71	0,093	6,11	0	<6,00	1,468	8,03	2,5	0,116	6,49	0,130	6,62
CNPC004	10	0,097	6,20	0,151	6,73	0	<5,58	>1,5	>8,06	2,5	0,128	6,58	0,184	6,89
CNPC007	18	0,091	6,47	0,090	6,42	0,010	<6,60	>1,5	>8,60	2,5	0,147	7,29	0,160	7,37
CNPC020	10	0,116	6,50	0,215	7,27	0,013	<6,30	>1,5	>8,30	3,5	0,153	6,95	*>1,5	>8,29
EM1107	12	0,097	<6,12	0,140	6,40	0,010	<6,12	>1,5	>8,12	3,5	0,143	6,45	*0,584	7,63

Símbolos: CNPC001 *L. plantarum* CNPC001; CNPC002 *L. plantarum* CNPC002; CNPC003 *L. plantarum* CNPC003; CNPC004 *L. plantarum* CNPC004; CNPC007 *L. mucosae* CNPC007; CNPC020 *L. plantarum* CNPC020; EM1107 *L. rhamnosus* EM1107; ABS Absorbância; * valores em absorbância mais expressivos das cepas submetidas ao ensaio de resistência cruzada > Limite máximo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida e equação da reta utilizada para a conversão em UFC/mL e, posteriormente, log UFC/mL; < Limite mínimo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida e equação da reta utilizada para a conversão em UFC/mL e, posteriormente, log UFC/mL.

As cepas foram inicialmente cultivadas no estresse subletal osmótico e, posteriormente, desafiadas diretamente ao nível letal do estresse ácido (Tabela 4) a viabilidade das culturas foi comparada com aquelas submetidas apenas ao estresse ácido (Tabela 3). As cepas *L. plantarum* CNPC001, CNPC002 e CNPC020, bem como *L. rhamnosus* EM1107, obtiveram uma maior viabilidade em relação às demais, respectivamente o valor em absorbância 1,225; 1,059; 0,584 e >1,5 (Tabela 4), e multiplicaram-se de forma mais expressiva no pH letal usado para avaliação da resistência cruzada ao estresse ácido, comparadas àquelas que não foram desafiadas, onde os valores em absorbância corresponderam, respectivamente a 0,243; 0,160; 0,052 e 0,090 (Tabela 3).

Todas as culturas foram submetidas ao estresse subletal ácido permaneceram viáveis após recultivo em MRS tradicional – viabilidade final (t_{24h}) após recuperação em MRS (log/UFC mL) – como pode ser observado na Tabela 5. De forma que, os valores em absorbância ultrapassaram o limite máximo de detecção da concentração de microrganismos, indicando alta multiplicação celular, tais valores foram convertidos em UFC/mL e, posteriormente, em log UFC/mL.

Estudos sobre adaptação ao estresse ácido foram inicialmente investigados para patógenos alimentares, visto que podem influenciar de forma significativa na sobrevivência dessas bactérias em ambientes ácidos. Apesar de ser um mecanismo indesejado para microrganismos patógenos, podem ser eficazes para potencializar a sobrevivência de probióticos em matrizes ácidas e no trato gastrointestinal (TERPOU *et al.*, 2019). Alguns autores avaliam os mecanismos potenciais de resposta ao estresse de bactérias lácticas, a fim de melhorar sua capacidade de sobreviver em condições de produção industrial (CHEN *et al.*, 2017; MONTORO *et al.*, 2018).

Das sete culturas avaliadas no estudo de resistência cruzada, utilizando o pré-cultivo em condição subletal ácida (Tabela 5), as cepas *L. plantarum* CNPC001 e CNPC003, como também *L. rhamnsous* EM1107, não apresentaram diferença significativa nos resultados obtidos em log/UFC mL – viabilidade final (t_{24h}) obtida em MRS acidificado – quando comparados aos ensaio de viabilidade das culturas (log UFC/mL) no estresse ácido, comportando-se de maneira semelhante, não havendo multiplicação bacteriana.

As cepas foram inicialmente cultivadas no estresse subletal ácido e, posteriormente, desafiadas diretamente ao nível letal do estresse osmótico (Tabela 5) a viabilidade das culturas foi comparada com aquelas submetidas apenas ao estresse osmótico (Tabela 2). As cepas *L. plantarum* CNPC002 e CNPC004 e CNPC020, assim como *L. mucosae* CNPC007, obtiveram uma maior viabilidade em relação às demais com, respectivamente, valores em absorbância

iguais a 0,444; 0,943; 1,115 e 0,306 (Tabela 5), as quais multiplicaram-se de forma mais expressiva em concentrações de NaCl letal usado para avaliação da resistência cruzada ao estresse osmótico, comparadas àquelas que não foram desafiadas, onde os valores em absorbância corresponderam, respectivamente, a 0,061; 0,137; 0,105 e 0,033 (Tabela 2). A resposta ao estresse osmótico envolve o acúmulo de solutos compatíveis e ativação de proteínas associadas à membrana para manter a pressão de turgescência da célula (SERRAZANETTI *et al.*, 2009).

O melhoramento da viabilidade das culturas nativas observados a partir dos ensaios de resistência cruzada corroboram com alguns autores, que apontam a utilização controlada de estresses subletais como resultantes na expressão de genes que atuam na proteção contra estresses ambientais e gastrointestinais (TERPOU *et al.*, 2019; TEODORO *et al.*, 2021). As cepas *L. plantarum* CNPC002 e CNPC020 foram as únicas a apresentarem uma maior resposta adaptativa, em termos de viabilidade, quando submetidas ao ensaio de resistência cruzada, tanto após o estresse subletal prévio ácido quanto osmótico. A utilização de ferramentas biotecnológicas como essa pode ser um ponto de partida para facilitar a utilização de probióticos tanto no processamento industrial, quanto no aumento da viabilidade gástrica desses microrganismos no trânsito intestinal, aumentando a capacidade de resultarem em benefícios aos consumidores.

Tabela 5 – Avaliação da resistência cruzada a partir de cepas inicialmente submetidas ao estresse ácido

Cultura	pH subletal usado para avaliação da resistência cruzada ao estresse	Viabilidade inicial (t _{0h}) em MRS acidificado		Viabilidade inicial (t _{24h}) em MRS acidificado		Viabilidade inicial (t _{0h}) após recuperação em MRS		Viabilidade final (t _{24h}) após recuperação em MRS		Concentração letal de NaCl usada no MRS (g/mL)	Viabilidade inicial (t _{0h}) em MRS - NaCl		Viabilidade final (t _{24h}) obtida em MRS- NaCl	
	pH	ABS	log UFC/mL	ABS	log UFC/mL	ABS	log UFC/mL	ABS	log UFC/mL	NaCl (g/mL)	ABS	log UFC/mL	ABS	log UFC/mL
CNPC001	3,5	0,142	6,65	0,889	7,60	0,020	<5,80	>1,5	>8,28	12	0,127	6,57	0,140	6,64
CNPC002	3,5	0,173	6,89	1,128	6,94	0,024	<6,03	>1,5	>8,50	10	0,134	6,66	0,444*	7,48
CNPC003	3,5	0,153	6,79	0,757	7,72	0,052	<6,00	>1,5	>8,48	14	0,086	5,87	0,087	5,92
CNPC004	2,5	0,159	6,78	0,190	6,91	0,005	<5,58	>1,5	>8,06	10	0,099	6,24	0,943*	7,91
CNPC007	2,5	0,188	7,50	0,191	7,51	0,007	<6,60	>1,5	>8,06	18	0,139	7,24	1,145*	8,50
CNPC020	3,5	0,144	6,88	1,278	8,26	0,053	<6,30	>1,5	>8,30	12	0,130	6,73	0,306*	7,51
EM1107	3,5	0,067	<6,12	0,403	7,42	0,018	<6,12	>1,5	>8,12	14	0,096	<6,12	0,126	6,10

Símbolos: CNPC001 *L. plantarum* CNPC001; CNPC002 *L. plantarum* CNPC002; CNPC003 *L. plantarum* CNPC003; CNPC004 *L. plantarum* CNPC004; CNPC007 *L. mucosae* CNPC007; CNPC020 *L. plantarum* CNPC020; EM1107 *L. rhamnosus* EM1107; ABS Absorbância; valores em absorbância mais expressivos das cepas submetidas ao ensaio de resistência cruzada; > Limite máximo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida e equação da reta utilizada para a conversão em UFC/mL e, posteriormente, log UFC/mL; < Limite mínimo de detecção da concentração de microrganismos em função da absorbância obtida e equação da reta utilizada para a conversão em UFC/mL e, posteriormente, log UFC/mL.

4 CONCLUSÃO

Quanto à capacidade de sobrevivência em condições de estresse ácido, as culturas comportam-se de forma semelhante entre si, não havendo multiplicação bacteriana, sendo necessários mais estudos para determinar o exato pH subletal de cada cepa. Tratando-se da capacidade de sobrevivência nas condições de estresse osmótico, todas as cepas multiplicaram-se até a concentração de 2 g/mL de NaCl e, em especial, *L. plantarum* CNPC020 que se destacou por ser capaz de se multiplicar em 8 g/mL de NaCl tal qual em MRS tradicional, igualmente ao verificado para *L. plantarum* CNPC001 e CNPC004 na concentração 6g mL de NaCl. Embora com redução numérica de viabilidade quando comparada ao MRS tradicional, outras cepas que obtiveram viabilidade acima de 8 log UFC/mL em 8g/mL de NaCl foram *L. mucosae* CNPC007 e *L. rhamnosus* EM1107. Em relação à capacidade de sobrevivência em elevadas temperaturas, não houve multiplicação celular, todas as culturas apresentaram-se termossensíveis entre 53 °C e 60 °C.

Quanto à influência do estresse cruzado sobre a capacidade de sobrevivência, destacaram-se as cepas *L. plantarum* CNPC002, CNPC004 e CNPC020, bem como *L. mucosae* CNPC007, por serem capazes de se multiplicarem de forma mais expressiva em concentrações letais de NaCl após exposição prévia às condições subletais ácidas quando comparadas às mesmas culturas avaliadas no ensaio isolado de estresse osmótico. Por sua vez, com o desafio prévio às condições subletais de estresse osmótico do ensaio de resistência cruzada, as cepas *L. plantarum* CNPC001, CNPC002 e CNPC020, como também *L. rhamnosus* EM1107, apresentaram aumento na viabilidade em pH 3,5, tanto em relação às demais culturas, como na comparação às mesmas culturas submetidas ao ensaio isolado de estresse ácido e, dessa forma, essas cepas provavelmente se tornaram mais viáveis tanto às condições ácidas do pH do estômago, como de produtos alimentícios mais ácidos.

Conclui-se que as cepas *L. plantarum* CNPC001 e CNPC020, assim como *L. rhamnosus* EM1107, após o ensaio de resistência cruzada, apresentaram-se mais viáveis em ambientes ácidos, as cepas *L. plantarum* CNPC004 e CNPC020, juntamente com *L. mucosae* CNPC007, são mais adaptadas a ambientes de elevada osmolaridade, enquanto que *L. plantarum* CNPC002 mostrou adaptabilidade a esses dois ambientes. Dessa forma, a utilização de estresse subletal prévio pode aumentar a sobrevivência de probióticos a condições posteriores de estresse, como condições adversas de processamento e armazenamento dos alimentos. Portanto, foi possível obter cepas com viabilidade aumentada em condições adversas ácidas e de elevada osmolaridade no presente estudo.

REFERÊNCIAS

- AHMED, F. E. Genetically modified probiotics in foods. **Trends in Biotechnology**, London, v. 21, n. 11, p. 491-497, 2003.
- BACHMANN, H.; PRONK, J.; KLEEREBEZEM, M.; TEUSINK, B. Evolutionary engineering to enhance starter culture performance in food fermentations. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 32, p. 1-7, 2015.
- BORDALO T. L.; DOS SANTOS, K. M. O.; DE LUCES F. F. C. L.; RIBEIRO, S. M. R.; DE OLIVEIRA, L. L.; MARTINO, H. S. D. Gut microbiota and probiotics: focus on diabetes mellitus. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 57, n. 11, p. 2296-2309, 2017.
- BOTTA, C.; LANGERHOLC, T.; CENCIČ, A.; COCOLIN, L. *In vitro* selection and characterization of new probiotic candidates from table olive microbiota. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e94457, 2014.
- BURITI, F. C. A.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. Probiotic and prebiotic dairy desserts. *In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: bioactive foods in health promotion.* Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 345–360.
- BURITI, F. C.; CASTRO, A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2-3, p. 121-129, 2010.
- BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Chilled milk-based desserts as emerging probiotic and prebiotic products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 54, n. 2, p. 139-150, 2014.
- ÇAKAR, Z. P.; TURANLI-YILDIZ, B.; ALKIM, C.; YILMAZ, Ü. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 171-182, 2012.
- ÇAKAR, Z. P.; SEKER, U. O. S.; TAMERLER, C.; SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 5, n. 6-7, p. 569-578, 2005.
- CAPURSO, L. Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 53, p. S1-S41, 2019.
- CEBRIAN, R., B. A.; VALDIVIA, E.; PÉREZ-PULIDO, R.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MAQUEDA, Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. **Food Microbiology**, London, v. 30, p.59-67,2011.
- CHAMKHA, M.; SAYADI, S.; BRU, V.; GODON, J. J. Microbial diversity in Tunisian olive fermentation brine as evaluated by small subunit rRNA-Single strand conformation polymorphism analysis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1-2, p. 211-215, 2008.

- CHEN, M.; TANG, H.; CHIANG, M. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefiranofaciens* M1. **Food Microbiology**, London, v. 66, p. 20-27, 2017
- CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 14, n. 14, p. 1382-1399, 2008.
- CREMON, C.; BARBARO, M. R.; VENTURA, M.; BARBARA, G. Pre-and probiotic overview. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxfordshire, v. 43, p. 87-92, 2018.
- DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. **Proteomics**, Hoboken, v. 4, n. 1, p. 106-122, 2004.
- DE LE BLANC, A. M.; LE BLANC, J. G. Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. **World Journal of Gastroenterology**, Pleasanton, v. 20, n. 44, p. 16518, 2014.
- DESMOND, C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, K.; ROSS, R. P. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. **International Dairy Journal**, Kidlington, v. 12, n. 2-3, p. 183-190, 2002.
- DIANAWATI, D.; SHAH, N. P. Survival, acid and bile tolerance, and surface hydrophobicity of microencapsulated *B. animalis* ssp. *lactis* Bb12 during storage at room temperature. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 76, n. 9, p. M592-M599, 2011.
- DING, W. K.; SHAH, N. P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 74, n. 2, p. M100-M107, 2009.
- DOS SANTOS, D.; GELINSKI, J. M. L. N. Culturas iniciadoras de fermentação em vinhos. **Evidência**, [s. l.], v. 8, n. 1-2, p. 57-84, 2008.
- DOS SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; BURITI, F. C. A.; DO NASCIMENTO, J. C. F.; DE MELO, M. E. S.; BRUNO, L. M.; TODOROV, S. D. Artisanal coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science and Technology**, Paris, v. 95, n. 2, p. 209-230, 2015.
- DOUILLARD, F. P.; DE VOS, W. M. Biotechnology of health-promoting bacteria. **Biotechnology Advances**, Kidlington, v. 37, n. 6, p. 107369, 2019.
- FAO/WHO. **Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food, including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, Argentina: FAO/WHO, 2001.
- FENG, J.; WANG, L.; ZHOU, L.; YANG, X.; ZHAO, X. Using *in vitro* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria for selection of probiotics against *Salmonella* infection in broiler chicks. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e0147630, 2016.
- FERREIRA, A. B. **Respostas fisiológicas e moleculares de *Lactobacillus delbrueckii* UFV**

H2b20 aos estresses ácido e por sais biliares. 2011. 118 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, MG, 2011.

GALLINA, D. A.; ANTUNES, A. E.; AZAMBUJA-FERREIRA, N. C.; MENDONÇA, J. B.; NORBONA, R. A. Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação da viabilidade das bifidobactérias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 386, p. 45-54, 2012.

GALLINA, D. A.; SILVA, A. T.; DE SOUZA TRENTO, F. K. H.; 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. **Journal of Health Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 4, 2011.

GARDINER, G. E.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M. A. E.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; STANTON, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 6, p. 2605-2612, 2000.

GÓMEZ-GUZMÁN, M.; TORAL, M.; ROMERO, M.; JIMÉNEZ, R.; GALINDO, P.; SÁNCHEZ, M.; DUARTE, J. Antihypertensive effects of probiotics *Lactobacillus* strains in spontaneously hypertensive rats. **Molecular Nutrition and Food Research**, Hoboken, v. 59, p. 2326-2336, 2015.

GÓMEZ-RUIZ, J. Á.; CABEZAS, L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M. Á.; & POVEDA, J. M. Influence of a defined-strain starter and *Lactobacillus plantarum* as adjunct culture on volatile compounds and sensory characteristics of Manchego cheese. **European Food Research and Technology**, New York, v. 227, n. 1, p. 181-190, 2008.

GUAN, N.; LIU, L.; SHIN, H. D.; CHEN, R. R.; ZHANG, J.; LI, J.; CHEN, J. Systems-level understanding of how *Propionibacterium acidipropionici* respond to propionic acid stress at the microenvironment levels: mechanism and application. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 167, n. 1, p. 56-63, 2013.

HAYEK, S. A.; IBRAHIM, S. A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. **Food and Nutrition Sciences**, [s.l.], 4, 73-87, 2013.

HE, A.; PENIX, S. R.; BASTING, P. J.; GRIFFITH, J. M.; CREAMER, K. E.; CAMPERCHIOLI, D.; SLONCZEWSKI, J. L. Acid evolution of *Escherichia coli* K-12 eliminates amino acid decarboxylases and reregulates catabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 83, n. 12, p. e00442-17, 2017.

HIDALGO-CANTABRANA, C.; SÁNCHEZ, B.; MILANI, C.; VENTURA, M.; MARGOLLES, A.; RUAS-MADIEDO, P. Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 1, p. 9-18, 2014.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews**

Gastroenterology & Hepatology, London, v. 11, p. 506–514, 2014.

HUSSAIN, M. A.; LIU, H.; WANG, Q.; ZHONG, F.; GUO, Q.; BALAMURUGAN, S. Use of encapsulated bacteriophages to enhance farm to fork food safety. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 57, n. 13, p. 2801-2810, 2017.

ISENRING, J.; GEIRNAERT, A.; HALL, A. R.; JANS, C.; LACROIX, C.; STEVENS, M. J. *In vitro* gut modeling as a tool for adaptive evolutionary engineering of *Lactiplantibacillus plantarum*. **Msystems**, Washington, v. 6, n. 2, p. e01085-20, 2021.

JAIN, P. K.; JAIN, V.; SINGH, A. K.; CHAUHAN, A.; SINHA, S. Evaluation on the responses of succinate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase to acid shock generated acid tolerance in *Escherichia coli*. **Advanced Biomedical Research**, Mumbai, v. 2, 2013.

JANKOVIĆ, T.; FRECE, J.; ABRAM, M.; GOBIN, I. Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **International Journal of Sanitary Engineering Research**, [s. l.] v. 6, n. 1, p. 19-24, 2012.

KIM, W. S.; PERL, L.; PARK, J. H.; TANDIANUS, J. E.; DUNN, N. W. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Current Microbiology**, New York, v. 3, p. 346-350, 2001.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [São Paulo] v. 44, p. 329-347, 2008.

LIU, H.; CUI, S. W.; CHEN, M.; LI, Y.; LIANG, R.; XU, F.; ZHONG, F. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 59, n. 17, p. 2863-2878, 2019.

LIU, H.; GONG, J.; CHABOT, D.; MILLER, S. S.; CUI, S. W.; ZHONG, F.; WANG, Q. Improved survival of *Lactobacillus zeae* LB1 in a spray dried alginate-protein matrix. **Food Hydrocolloids**, Oxfordshire, v. 78, p. 100-108, 2018.

LIU, Y.; YANG, X.; YIN, Y.; LIN, J.; CHEN, C.; PAN, J.; SHEN, X. Mycothiol protects *Corynebacterium glutamicum* against acid stress via maintaining intracellular pH homeostasis, scavenging ROS, and S-mycothiolating MetE. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, 2016.

LU, P.; MA, D.; CHEN, Y.; GUO, Y.; CHEN, G. Q.; DENG, H.; SHI, Y. L-glutamine provides acid resistance for *Escherichia coli* through enzymatic release of ammonia. **Cell Research**, London, v. 23, n. 5, p. 635-644, 2013.

MA, J.; XU, C.; LIU, F.; HOU, J.; SHAO, H.; YU, W. Stress adaptation and cross-protection of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0628. **CyTA-Journal of Food**, Abingdon, v. 19, n. 1, p. 72-80, 2021.

MANSUR, A.; GRUBEN, L. V.; POPOV, A. F.; STEINAU, M.; BERGMANN, I.; ROSS, D.;

- HINZ, J. The regulatory toll-like receptor 4 genetic polymorphism rs11536889 is associated with renal, coagulation and hepatic organ failure in sepsis patients. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2014.
- MANS, R. ; DARAN, J. G.; PRONK, J. T. Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 50, p. 47-56, 2018.
- 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 & Emerging Technologies**, Kidlington, v. 27, p. 15-25, 2015.
- MARTINEZ, R. C. R.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 114, n. 12, p. 1993-2015, 2015.
- MATHIPA, M. G.; THANTSHA, M. S. Cocktails of probiotics pre-adapted to multiple stress factors are more robust under simulated gastrointestinal conditions than their parental counterparts and exhibit enhanced antagonistic capabilities against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Gut Pathogens**, London, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2015.
- MILESI, M. M.; MCSWEENEY, P. L. H.; HYNES, E. R. Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 105, n. 3, p. 884-892, 2008
- MILLER, E. F.; MAIER, R. J. Ammonium metabolism enzymes aid *Helicobacter pylori* acid resistance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 196, n. 17, p. 3074-3081, 2014.
- MONTORO, B. P.; BENOMAR, N.; GÓMEZ, N. C.; ENNAHAR, S.; HORVATOVICH, P.; KNAPP, C. W.; ABRIOUEL, H. Proteomic analysis of *Lactobacillus pentosus* for the identification of potential markers involved in acid resistance and their influence on other probiotic features. **Food Microbiology**, London, v. 72, p. 31-38, 2018.
- MURUZOVIC, M. Ž.; MLADENOVIC, K. G.; ČOMIC, L. R. *In vitro* evaluation of resistance to environmental stress by planktonic and biofilm form of lactic acid bacteria isolated from traditionally made cheese from Serbia. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 23, p. 54-59, 2018.
- NGUYEN, H. T.; TRUONG, D. H.; KOUHOUNDÉ, S.; LY, S.; RAZAFINDRALAMBO, H.; DELVIGNE, F. Biochemical engineering approaches for increasing viability and functionality of probiotic bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 867, 2016.
- NGUYEN, H. T.; RAZAFINDRALAMBO, H.; BLECKER, C.; N'YAPO, C.; THONART, P.; DELVIGNE, F. Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze-drying. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 88, p. 85-94, 2014.
- PEREIRA, Á. M. S.; DE FARIAS, D. R. B.; DE QUEIROZ, B. B.; NOBRE, M. S. C.,

CAVALCANTI, M. T.; SALLES, H. O.; BURITI, F. C. O. Influence of a co-culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei* on the proteolysis and ACE-inhibitory activity of a beverage based on reconstituted goat whey powder. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, New York, v. 11, n. 1, p. 273-282, 2019.

PÉREZ-TORRADO, R.; QUEROL, A.; GUILLAMÓN, J. M. Genetic improvement of non-GMO wine yeasts: strategies, advantages and safety. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 45, n. 1, p. 1-11, 2015.

PHADTARE, S.; ALSINA, J.; INOUE, M. Cold-shock response and cold-shock proteins. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, n. 2, p. 175-180, 1999.

PRASAD, J.; MCJARROW, P.; GOPAL, P. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 2, p. 917-925, 2003.

PULIDO FONTES, L.; QUESADA JIMENEZ, P.; MENDIOROZ IRIARTE, M. Epigenética y epilepsia. **Neurologia**, Barcelona, v. 30, n. 2, p. 111-118, 2015.

REIS, A. R. **Probióticos, potencialidades e desafios**. Trabalho Apresentado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2019.

REQUE; P. M.; BRANDELLI, A. An introduction to probiotics. *In*: BRANDELLI, A. **Probiotics: advanced food and health applications**. London: Academic Press, 2021. p. 1- 17.

SAAD, S. M. I.; FARIA, J. D. A. F.; CRUZ, A. G. D. Probióticos e prebióticos em alimentos: aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011. p. 23-49.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SAARELA, M.; RANTALA, M.; HALLAMAA, K.; NOHYNEK, L.; VIRKAJÄRVI, I.; MÄTTÖ, J. Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 96, n. 6, p. 1205-1214, 2004.

SÁNCHEZ, B.; CHAMPOMIER-VERGES, M. C.; COLLADO, M. D. C.; ANGLADE, P.; BARAIGE, F.; SANZ, Y.; ZAGOREC, M. Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype longum. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 20, p. 6450-6459, 2007.

SÁNCHEZ, B.; DELGADO, S.; BLANCO-MÍGUEZ, A.; LOURENÇO, A.; GUEIMONDE, M.; MARGOLLES, A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, Hoboken, v. 61, n. 1, p. 1600240, 2017.

SANTOS, D. X.; SAAD, S. M. I.; BEDANI, R.; DÓREA, E. L. Impact of probiotics and prebiotics targeting metabolic syndrome. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 64, p. 1-17 art. 103666, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103666>. Acesso em:

17 de outubro de 2022.

ŠEME, H.; GJURAČIĆ, K.; KOS, B.; FUJS, Š.; ŠTEMPELJ, M.; PETKOVIĆ, H.; KOSEC, G. Acid resistance and response to pH-induced stress in two *Lactobacillus plantarum* strains with probiotic potential. **Beneficial Microbes**, Wageningen, v. 6, n. 3, p. 369-379, 2015.

SERRAZANETTI, D. I.; GUERZONI, M. E.; CORSETTI, A.; VOGEL, R. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 7, p. 700-711, 2009.

SHAH, A.; GANI, A.; AHMAD, M.; ASHWAR, B. A.; MASOODI, F. A. β -Glucan as an encapsulating agent: effect on probiotic survival in simulated gastrointestinal tract. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 82, p. 217-222, 2016.

SOHLENKAMP, C. Membrane homeostasis in bacteria upon pH challenge. *In*: GEIGER, O. (ed.). **Biogenesis of fatty acids, lipids and membranes**. [S. l.]: Springer Cham, 2017. p. 1-13.

STANTON, C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, n. 2, p.198-203, 2005.

STEINBERG, F. Biotecnologia farmacêutica e bioterapia: uma visão geral. **Society for Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1-17, 2002.

TAN, Y. S.; ZHANG, R. K.; LIU, Z. H.; LI, B. Z.; YUAN, Y. J. Microbial adaptation to enhance stress tolerance. **Frontiers in Microbiology**, Basel, v. 13, 2022.

TEODORO, N. X.; PEREIRA, Á. M. S.; DOS SANTOS, K. M. O.; ALONSO BURITI, F. C. Aplicação da biotecnologia no desenvolvimento de alimentos funcionais: uma revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 37, n. 1, 2021.

TERPOU, A.; PAPADAKI, A.; LAPPA, I. K.; KACHRIMANIDOU, V.; BOSNEA, L. A.; KOPSAHELIS, N. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**, Basel, v. 11, n. 7, p. 1591, 2019.

TODOROV, S. D.; BOTES, M.; GUIGAS, C.; SCHILLINGER, U.; WIID, I.; WACHSMAN, M. B.; DICKS, L. M. T. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v.104, p.465-477, 2008.

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

VAN DEN BROEK, M. F. L.; DE BOECK, I.; CLAES, I. J. J.; NIZET, V.; LEBEER, S. Multifactorial inhibition of lactobacilli against the respiratory tract pathogen *Moraxella catarrhalis*. **Beneficial Microbes**, Wageningen, v. 9, n. 3, p. 429-439, 2018.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probióticos: informações atualizadas. **Jornal de Pediatria**, v. 91, p. 06-21, 2015.

VINDEROLA, G.; CAPELLINI, B.; VILLARREAL, F.; SUÁREZ, V.; QUIBERONI, A.; & REINHEIMER, J. Usefulness of a set of simple *in vitro* tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. **LWT-Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 41, n. 9, p. 1678-1688, 2008.

WANG, S. HOU, Y.; CHEN, X.; LIU, L. Kick-starting evolution efficiency with an autonomous evolution mutation system. **Metabolic Engineering**, San Diego, v. 54, p. 127-136, 2019.

WINKLER, J. D.; KAO, K. C. Recent advances in the evolutionary engineering of industrial biocatalysts. **Genomics**, San Diego, v. 104, n. 6, p. 406-411, 2014.

WU, C.; HUANG, J.; ZHOU, R. Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 98, n. 3, p. 1055-1063, 2014.

XAVIER-SANTOS, D.; BEDANI, R.; LIMA, E. D.; SAAD, S. M. I. Impact of probiotics and prebiotics targeting metabolic syndrome. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 64, p. 1-17 art. 103666, 2020.

ZAGATO, E.; MILETI, E.; MASSIMILIANO, L.; FASANO, F.; BUDELLI, A.; PENNA, G.; RESCIGNO, M. *Lactobacillus paracasei* CBA L74 metabolic products and fermented milk for infant formula have anti-inflammatory activity on dendritic cells *in vitro* and protective effects against colitis and an enteric pathogen *in vivo*. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e87615, 2014.

ZOTTA, T.; PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 122, n. 4, p. 857-869, 2017.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M.; HARRIS, H. M.; MATTARELLI, P.; LEBEER, 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**, London, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.