



Universidade dos Açores
Departamento de Ciências Agrárias

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA
DAS BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO
DO QUEIJO SÃO JORGE DOP

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar

Realizado por:

Lucrecia de Jesus Melo da Silva

Orientada por:

José Estevam Matos

Maria da Graça da Silveira

Angra do Heroísmo 2011

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia Alimentar, no âmbito da cadeira de Dissertação do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, no Departamento de Ciências Agrárias, da Universidade dos Açores, sob orientação do Prof. Doutor José Estevam Matos e da Prof. Doutora Maria da Graça da Silveira. Com patrocínio das seguintes entidades:



Através do financiamento dos projectos: IBBA R&D Projects - REF: M2.1.2/1/027/2008; e de uma bolsa de iniciação científica (BIC) - Atribuída pelo Fundo Regional da Ciência e Tecnologia.

“In nature we never see anything isolated, but everything in connection with something else.” (Johann Wolfgang von Goethe)

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização desta dissertação, nomeadamente:

Aos meus orientadores Prof. Doutor José Estevam Matos e Prof. Doutora Maria da Graça da Silveira, pela orientação e dedicação fornecida ao longo deste trabalho.

Às três cooperativas de São Jorge, Finisterra, Beira e Lourais, que me cederam as amostras e enviaram-nas por avião, para a realização deste trabalho.

À Prof. Doutora Maria de Lurdes Dapkevicius pela disponibilidade e ajuda.

Às minhas colegas de trabalho Cátia Dias e Susana Vieira, pelo companheirismo, boa disposição e ajuda.

Às técnicas do Laboratório de Tecnologia Alimentar, Leovegilda Rodrigues e Sílvia Mendonça, pela disponibilidade e ajuda.

Às estagiárias Kerey Silva, Ana Rocha e Jéssica Charamba pela disponibilidade em ajudar.

Às minhas colegas de curso, Carolina Tavares e Sandra Câmara, por todo o companheirismo e força ao longo mestrado.

A todos o meu muito obrigado.

Dedicatória

Dedico esta dissertação à minha família e amigos.

De uma forma gratificante aos meus pais, Francisco e Maria Emília Silva, que me apoiaram e fizeram com que fosse possível o mestrado.

À minha irmã, Selma Silva e, namorado Rodrigo Silveira, pelo apoio dado e compreensão ao longo da realização do mestrado.

Resumo

O Queijo São Jorge DOP é um queijo tradicional da ilha de São Jorge, um produto emblemático dos lacticínios açorianos que adquiriu fama através das suas características organolépticas únicas, no entanto, poucos tem sido os trabalhos desenvolvidos para o estudo da sua microflora láctica. É bem conhecido que as bactérias lácticas ditas “selvagens”, provenientes de leite cru ou de “culturas de arranque” artesanais, como sejam o soro ou a coalhada guardados do fabrico anterior, estão ligadas às características de tipicidade dos queijos artesanais, não só porque influenciam o processo de acidificação do leite, acelerando a coagulação e a sinérese do soro, mas também porque contribuem directamente para o sabor, corpo e textura do queijo acabado (Awad *et al.*, 2007; Franciosi *et al.*, 2009). O presente trabalho teve como principal objectivo o isolamento e caracterização bioquímica das bactérias do ácido láctico (BAL) do Queijo São Jorge DOP. Obtiveram-se um total de 41 isolados puros pertencentes ao grupo das bactérias do ácido láctico, pertencentes às unidades taxonómicas: *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus ssp. curvatus*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus* e *Enterococcus durans*. As espécies mais frequentes foram o *Lb paracasei ssp. paracasei* e o *Lactococcus lactis ssp. lactis*.

A fim de aferir e caracterizar o potencial tecnológico destes isolados foram estudados: taxa de crescimento; velocidade de acidificação, capacidade de crescimento a diferentes pH e a diferentes concentrações de NaCl; produção de CO₂ a partir da glicose; a hidrólise da arginina; capacidade de acidificação do leite; a actividade proteolítica; produção de diacetilo; perfil enzimático; actividade antimicrobiana em relação à *Listeria monocytogenes* e ao *Staphylococcus aureus*; e o perfil de resistência a 10 antibióticos.

Para além de, pela primeira vez, nos Açores, se ter constituído uma colecção de isolados de BAL características do Queijo São Jorge DOP, devidamente preservadas e guardadas para estudos posteriores e para o eventual desenvolvimento futuro de uma Cultura de Arranque específica para este Queijo, evitando-se a contaminação com bactérias patogénicas pelo “soro fermento” hoje usado, os estudos realizados permitiram algumas ilações das quais destacamos:

Ao estudar a taxa de crescimento dos isolados verificou-se que não há uma relação entre os valores observados e a espécie e que também entre os isolados da mesma espécie há uma grande variabilidade, sendo um isolado da espécie *Lc. lactis ssp. lactis* (0,374 h⁻¹) que teve uma maior taxa de crescimento e o isolado da espécie *Lb. paracasei ssp. paracasei* a mais baixa (0,102 h⁻¹). Os isolados com uma maior velocidade de acidificação, após as 24 horas de crescimento, foram o *Lb. paracasei ssp. paracasei* e o *Lb. plantarum* (0,096 ΔpH/h), contudo foi o isolado da espécie *Lb. plantarum* que obteve um pH final mais baixo (3,7). Por outro lado, foi a espécie *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* que teve uma velocidade de acidificação menor (0,023 ΔpH/h) e também a espécie com um pH final mais elevado (4,7).

Relativamente à capacidade de acidificação do leite o *Lb. paracasei ssp. paracasei* revelou ser a bactéria com maior capacidade de acidificação tendo sido a que apresentou um pH às 4h mais baixo (6,4), sendo os isolados da estirpe *Enterococcus durans* e *Lc. lactis ssp. lactis* os que apresentaram uma maior acidificação, com pH de 6,2 e 6,3, respectivamente.

Verificou-se que o *Lb. plantarum* foi o que apresentou uma maior capacidade de inibição tanto da *L. monocytogenes* como do *S. aureus*. Este último foi o que se revelou menos sensível, além de que nenhum isolado foi capaz de inibi-lo quando se testou a actividade apenas dos sobrenadantes, sugerindo que o mecanismo de inibição exige o contacto das BAL com o agente patogénico. Avaliou-se ainda até que ponto a actividade antimicrobiana se devia ao abaixamento do pH, tendo-se verificado que efectivamente a actividade decrescia, ou mesmo se perdia completamente, ex. para o *Lb. paracasei ssp. paracasei* e para o *Lc. lactis ssp. lactis*, sempre que se neutralizou o meio. Os isolados de *Lc. lactis ssp. lactis* foram os únicos em que o sobrenadante perdeu a actividade após o tratamento térmico, o que constitui um forte indicador de que actividade antimicrobiana se deve a um composto de natureza proteica.

As espécies que melhor resistiram ao pH ácido foram *Lb. curvatus ssp. curvatus*, *Lb. rhamnosus*, e quase todos os isolados de *Lb. paracasei ssp. paracasei*, seguindo-se o *Lb. plantarum* e o *Enterococcus durans*.

As BAL estudadas denotaram alguma capacidade de crescer em ambientes salinos, contudo, alguns dos isolados foram inibidas em concentrações NaCl superiores a 6,5%. O *Lb. plantarum* foi a que apresentou melhor crescimento nas concentrações de 8% e 12%, seguindo-se o *Lb. curvatus ssp. curvatus*, alguns isolados da espécie *Lb. paracasei ssp. paracasei* e o *Pediococcus pentosaceus*.

Verificou-se que nenhum dos isolados produzia CO₂ a partir da glucose, não tendo assim a capacidade de formar olhos no queijo. Na hidrólise da arginina todos os isolados foram positivos. Algumas das BAL estudadas revelaram capacidade de produção de diacetilo a partir do citrato: *Lb. curvatus ssp. curvatus*, alguns isolados das espécies *Lb. paracasei ssp. paracasei*, *Lc. lactis ssp. lactis* e *Enterococcus durans*. Relativamente à actividade proteolítica à excepção do *Pediococcus pentosaceus*, todos os isolados foram positivos, contudo, na espécie *Lb. plantarum* esta actividade foi fraca.

As BAL têm a capacidade para a produção de um grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas. No entanto nenhuma das espécies isoladas produziu lipases. À excepção do *Lb. paracasei ssp. paracasei*, em todas as espécies foi identificada a produção de aminopeptidases. Apenas as espécies de *Lb. plantarum* e *Lb. rhamnosus* produziram a enzima β-galactosidase.

No teste de sensibilidade aos antibióticos verificou-se que a maior parte dos isolados se mostraram resistentes aos antibióticos testados, sendo na totalidade das estirpes resistentes ao cloranfenicol; 97,56% à rifampicina e à lincomicina, 95,12% à norfloxicina e à ampicilina 92,68% à penicilina; 82,93% à clindamicina e 78,05% à gentamicina e ao sulfametazol/trimetropina. No entanto, apresentaram maior sensibilidade intermédia à eritromicina (63,41%).

Palavras chave: Queijo São Jorge DOP; Bactérias do Ácido Lático; Atividade Antimicrobiana; Perfil Enzimático; Resistência aos Antibióticos; Leite cru.

Abstract

São Jorge PDO cheese is a traditional cheese from the island of São Jorge, a flagship product of Azorean dairy that became famous through its unique organoleptic characteristics, however, little work has been done for the study of its lactic microflora. It is well known that “wild” lactic acid bacteria from raw milk are linked to the typical characteristics of the artisanal cheeses, not only because they influence the process of acidification of milk, speeding coagulation and whey syneresis, but also because they directly contribute to the flavor, body and texture of the finished cheese (Awad et al. 2007; Franciosi et al., 2009). This work had as main objective the isolation and biochemical characterization of lactic acid bacteria (LAB) from São Jorge DOP cheese. A total of 41 pure isolates were obtained belonging to the group of lactic acid bacteria and to the following species: *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus* ssp. *curvatus*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus durans*. The most frequent species were *Lb paracasei* ssp. *paracasei* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*.

In order to measure and characterize the technological potential of these isolates the following aspects were studied: growth rates, acidification rate; growth capacity at different pH and different concentrations of NaCl; CO₂ production from glucose; hydrolysis of arginine; acidification ability of milk; proteolytic activity; production of diacetyl; enzymatic profile, antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, and resistance profile of the 10 antibiotics.

In addition of a collection of isolates of lactic acid bacteria specific of São Jorge cheese available for the first time in the Azores, properly preserved and stored for further studies and for future development of a specific starter culture for this cheese, avoiding contamination with pathogenic bacteria by the "whey starter" used today, this studies have allowed some additional knowledge about these lactic acid isolates:

By studying the rate of growth of the isolates revealed no correlation between the observations and each one the species. Among the isolates of the same species was also found a large variability. Isolates with a higher rate of acidification after 24 hours of growth, were *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* and the *Lb. plantarum* (Δ pH 0.096/h), however the species who obtained a lower final pH (3.7) was *Lb. plantarum*. On the other hand *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* had a lower rate of acidification (0.023 Δ pH/h). For the acidification in milk *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* proved to be the most capable with a lower pH at 4 hours (6.4). *Enterococcus durans* and *Lc. lactis* ssp. *lactis* who had a greater acidification potential attaining a pH 6.2 and 6.3, respectively.

It was found that the *Lb. plantarum* showed the greater capacity to inhibit both the *L. monocytogenes* and *S. aureus*. This last one proved to be less sensitive, and no one isolate was able to inhibit it when it was tested the activity of the supernatant, suggesting that the mechanism of inhibition of BAL requires contact with the pathogen. We also evaluated the extent to which antimicrobial activity was due to the lowering of pH. It was found that the activity actually decreased, or was even completely lost, eg for *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* and for *Lc. lactis* ssp. *lactis*, when the medium was neutralized. The supernatant of isolates the *Lc. lactis* ssp. *lactis* were the only one in loose its activity after heat treatment, which is strong indicator that antimicrobial activity is due to a compound proteic in nature.

The species that best withstood the acid pH were *Lb. curvatus* ssp. *curvatus*, *Lb. rhamnosus*, and almost all isolates of *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, followed by *Lb. plantarum* and *Enterococcus durans*.

The BAL studied denoted some ability to grow in saline environments, however, some of the isolates were inhibited at concentrations above 6.5% NaCl. The *Lb. plantarum* showed the best growth at concentrations of 8% and 12%, followed by *Lb. curvatus* ssp. *curvatus*, some isolates of the *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* and *Pediococcus pentosaceus*.

It was found that none of the isolates produced CO₂ from glucose. Hydrolysis of arginine in all isolates were positive. Some of the BAL study revealed a production capacity of diacetyl from citrate: *Lb. curvatus* ssp. *curvatus*, some isolates of *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* and *Enterococcus durans*. For the proteolytic activity all isolates were positive, other than *Pediococcus pentosaceus* however *Lb. plantarum* isolates had a weak activity.

BAL have the ability to produce a large number of glycolytic enzymes, lipolytic and proteolytic enzymes. However none of the isolated strains produced lipases. With the exception of *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, in all other species was identified the production of aminopeptidases. Only *Lb. plantarum* and *Lb. rhamnosus* produced the enzyme β -galactosidase.

The antibiotic sensitivity test showed that the majority of the isolates were resistant to the antibiotics tested. All the strains were resistant to chloramphenicol; 97.56% to rifampicin, and lincomycin; 95.12% to ampicillin and norfloxacin; 92.68% penicillin; 82.93% to clindamycin; and 78.05% to gentamicin and sulfamethoxazole/trimethoprim. However, most of them had an intermediate susceptibility to erythromycin (63.41%).

Keywords: São Jorge PDO Cheese, Lactic Acid Bacteria, Antimicrobial Activity, Enzymatic Profile, Antibiotic Resistance, Raw milk, .

Lista de Abreviações

ACK – Acilquinase
ADC – Descarboxilação da Arginina
ADF – Arginina desaminase
ADN – Ácido desoxirribonucleico
ALD – Descarboxilase α -acetolactato
ALDH – Aldeído desidrogenase
ALS - α -acetolactato
AT – Actividade antimicrobiana
TT- Tolerância ao ácido
ATP – Trifosfato de adenosina
B - *Bifidobacterium*
BAL - Bactérias do ácido láctico
BAs – Aminas Biogénicas
BCAAs – Valina, Isoleucina e Leucina
BHD – 2,3 butanediol desidrogenase
BHI – Brain Heart Infusion
C12 – Compostos aromáticos de 12 carbonos
C4 – Compostos aromáticos de 4 carbonos
CASFM - Comité de L'antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie
CBL – Cistationina β -liase
CGL – Cistationina γ -liase
CitS, CitP – Transportadores do citrato da família α -hidroxicarboxilato
CL – Citrato liase
CLA – Ácido linoleico conjugado
CLSI – Clinical Laboratory Standard Institute
coA – Coenzima A
DAR – Diacetil redutase
DO – Densidade óptica
DOP – Denominação de Origem Protegida
DtpT –Transportador de protões dependente de uma força motriz
EPS – Exopolissacarídeos
FFA – Ácidos gordos livres
GDH – Enzima desidrogenase

HADH – Hidróxido desidrogenase
K⁺-ATPases – ATP dependentes
K₂HPO₄ – di-potássio hidrogénio fosfato
KaDH – α-cetoácido desidrogenase
KOH – Hidróxido de potássio
KPi – Tampão de fosfato
L-ATR – Proteínas ácido resistentes
L. - *Listeria*
Lb. – *Lactobacillus*
Lc. – *Lactococcus*
LTA – Treonina aldose com especificidade baixa
M.G. - Matéria gorda
MGL – Metionina γ-liase
MRS – Man Rogosa Agar
MSE – Mayex, Sandine Elliker Agar
° D – Graus Dornic
OAD – Oxaloacetato descarboxilase
PCA – Plant Count Agar
pHi – pH intracelular
pmf – Motriz protónica
PrtM – Proteína ligada à membrana
PTS – Fosfotransferase fosfolpiruvato-dependente
rpm – Rotações por minuto
S. – *Staphylococcus*
SHMT – Serina hidroximetil transferase
TT – Tratamento térmico
UFC – Unidades formadoras de colónias
UHT – Ultra High Temperature
v/v – Volume/volume
ΔpH/h – Velocidade de acidificação

Índice

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Queijo São Jorge DOP	3
2.1.1. História	3
2.1.2. Descrição	5
2.1.3. Leite cru	6
2.1.4. Tecnologia de Fabrico do Queijo São Jorge	6
2.2. As Bactérias do Ácido Lático	8
2.2.1. Taxonomia	8
2.2.2. Caracterização	9
2.2.3. Fermentação	11
2.2.3.1. Via Homofermentativa	13
2.2.3.2. Via Heterofermentativa	13
2.2.3.3. Metabolismo da Lactose	14
2.2.3.4. Fermentação de outros Açúcares	15
2.2.4. Sistema Proteolítico das BAL	16
2.2.4.1. Catabolismo dos Aminoácidos e a Formação do <i>Flavour</i>	18
2.2.4.2. Metionina, Cisteína e Treonina	21
2.2.4.3. Vias das amino-biogénicas a partir dos aminoácidos	22
2.2.4.4. Metabolismo da Arginina	23
2.2.5. Metabolismo do Citrato e a formação de compostos aromáticos	23
2.2.5.1. Transporte do Citrato	24
2.2.5.2. Conversão do Citrato a Piruvato	25

2.2.5.3. Conversão do Piruvato a Compostos Aromáticos	25
2.2.6. Sistema Lipolítico das bactérias lácticas	26
2.2.7. Produção de Exopolissacarídeos	27
2.2.8. Actividade Antimicrobiana	28
2.2.8.1. Bacteriocinas	29
2.2.9. Resistência das BAL aos Antibióticos	31
2.2.10. Crescimento das BAL em ambiente ácido	33
2.2.11. O uso das Bactérias do Ácido Láctico em produtos Probióticos	35
3. Materiais e Métodos	39
3.1. Amostra	39
3.1.2. Caracterização e Colheita das Amostras	39
3.2. Meios de Cultura	39
3.3. Condições de Incubação	40
3.4. Isolamento das bactérias do ácido láctico	40
3.5. Caracterização e Identificação dos diferentes isolados	40
3.5.1 Crescimento dos Isolados para os diferentes testes	41
3.5.2 Fermentação dos Hidratos de Carbono	41
3.5.3 Curvas de Crescimento	41
3.5.4 Capacidade de Crescimento a diferentes pH	42
3.5.5 Capacidade de Crescimento a diferentes concentrações de NaCl	42
3.5.6 Capacidade de Crescimento a diferentes temperaturas	42
3.5.7 Produção de CO ₂ a partir da Glucose	43
3.5.8 Hidrólise da Arginina	43
3.5.9 Capacidade de Acidificação	44
3.5.10 Actividade Proteolítica	44
3.5.11 Produção de Diacetilo	44
3.5.12 Perfil enzimático	45
3.5.13 Actividade Antimicrobiana	45
3.5.14 Resistência a Antibióticos	47
4. Resultados	49
4.1. Isolamento de diferentes colónias	49
4.2. Caracterização Fenotípica e Bioquímica dos Isolados	50

4.2.1.	Caracterização Morfológica das Colónias	50
4.2.2.	Morfologia das Células	52
4.2.3.	Teste da Catalase e Oxidase	53
4.2.4.	Fermentação dos Carbohidratos	54
4.2.5.	Curvas de Crescimento	55
4.2.6.	Capacidade de Crescimento a diferentes pH	59
4.2.7.	Capacidade de Crescimento a diferentes concentrações de NaCl	60
4.2.8.	Capacidade de Crescimento a diferentes temperaturas	61
4.2.9.	Produção de CO ₂ a partir da Glucose	66
4.2.10.	Hidrólise da Arginina	66
4.2.11.	Capacidade de Acidificação	66
4.2.12.	Actividade Proteolítica	68
4.2.13.	Produção de Diacetilo	69
4.2.14.	Perfil Enzimático	70
4.2.15.	Actividade Antimicrobiana das BAL	72
4.2.15.1.	Actividade Antimicrobiana em relação à <i>Listeria monocytogenes</i>	72
4.2.15.2.	Actividade Antimicrobiana em relação ao <i>Staphylococcus aureus</i>	76
4.2.16	Resistência aos Antibióticos	78
5.	Discussão	81
6.	Conclusão	88
7.	Bibliografia	90
Anexos		100

Índice de Figuras

Figura 2.1. Rótulo DOP Europeu e Rótulo Queijo São Jorge como Selo de Garantia.	5
Figura 2.2. Actuação das bactérias do ácido láctico sobre os componentes do leite durante a maturação do queijo e formação de substâncias aromáticas.	7
Figura 2.3. Diagrama de fluxo do processamento do Queijo São Jorge DOP.	8
Figura 2.4. Produtos responsáveis pela formação de <i>flavours</i> no queijo: vias metabólicas.	12
Figura 2.5. Vias de fermentação da glucose, Via Homofermentativa e Via Heterofermentativa.	14
Figura 2.6. Metabolismo da Lactose.	15
Figura 2.7. Metabolismo Proteolítico das bactérias do ácido láctico.	17
Figura 2.8. Vias Catabólicas dos principais aminoácidos envolvidos na produção dos compostos aromáticos.	19
Figura 2.9. Metabolismo do Citrato em estirpes de <i>Lactococcus</i> e <i>Leuconostoc</i> .	24
Figura 2.10. Benefícios do uso de probióticos para o hospedeiro.	36
Figura 3.1. Classificação das diferentes tonalidades do vermelho no teste de verificação da produção de diacetil.	45
Figura 4.1. Morfologia das diferentes colónias em meio MRS Agar (A), M17 Agar (B) e MSE Agar (C).	51
Figura 4.2. Distribuição percentual dos 83 isolados considerados puros, em função da sua morfologia.	52
Figura 4.3. Diferentes morfologias das células das BAL.	53
Figura 4.4. Leituras do pH em leite UHT gordo inoculado com isolados do Género <i>Lactobacillus</i> .	67

Figura 4.5. Leituras do pH em leite UHT gordo inoculado com isolados do Géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. 67

Figura 4.6. Actividade Proteolítica dos isolados de BAL. 68

Índice de Quadros

Quadro 2.1. Grupos de bactérias do ácido láctico e o seu tipo de fermentação. 12

Quadro 2.2. Resistência a alguns antibióticos pelas BAL. 33

Quadro 2.3. Algumas propriedades das bactérias probióticas. 37

Quadro 4.1. Número de isolados por amostra de soro fermento. 49

Quadro 4.2. Isolados obtidos nos diferentes meios de cultura, a diferentes temperaturas. 50

Quadro 4.3. Resultados da identificação dos 83 isolados através de galerias miniaturizadas API 50 CHL e API 20 STREP. 54

Quadro 4.4. Taxas de crescimento, velocidade de acidificação e pH final dos vários isolados *Lactobacillus*. 56

Quadro 4.5. Taxas de crescimento, velocidade de acidificação e pH final dos isolados *Lc. lactis ssp. lactis*. 57

Quadro 4.6. Taxas de crescimento, velocidade de acidificação e pH final dos isolados *Enterococcus durans*. 58

Quadro 4.7. Taxas de crescimento, velocidade de acidificação e pH final dos isolados *Pediococcus pentosaceus*. 58

Quadro 4.8. Taxa de crescimento, velocidade de acidificação e pH final do isolado *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. 58

Quadro 4.9. Resultados do estudo do crescimento do grupo de lactobacilos isolados, nomeadamente, crescimento a diferentes pH, concentrações de NaCl e temperaturas. 63

Quadro 4.10. Resultados do estudo do crescimento para as espécies *Enterococcus durans*, *Pediococcus pentosaceus* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, nomeadamente, crescimento a diferentes pH, concentrações de NaCl e temperaturas. 64

- Quadro 4.11.** Resultados do estudo do crescimento para as espécies *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*, nomeadamente, crescimento a diferentes pH, concentrações de NaCl e temperaturas. 65
- Quadro 4.12.** Actividade proteolítica dos isolados BAL, verificado após 4 dias de crescimento a 37°C. 68
- Quadro 4.13.** Resultados da produção de diacetilo dos vários isolados de BAL testados (Consoante a intensidade da cor do anel formado, os resultados foram classificados de fraco, médio e forte). 69
- Quadro 4.14.** Enzimas produzidas pelas diversas BAL isoladas do soro fermento do Queijo São Jorge DOP. 71
- Quadro 4.15.** Comparação dos halos de inibição (em mm) revelando a actividade antimicrobiana dos isolados Lactobacilos em relação à *Listeria monocytogenes*. 74
- Quadro 4.16.** Comparação dos halos de inibição (em mm) revelando a actividade antimicrobiana dos isolados *Lc. lactis* ssp. *lactis* em relação à *Listeria monocytogenes*. 74
- Quadro 4.17.** Comparação dos halos de inibição (em mm) revelando actividade antimicrobiana dos isolados de *Enterococcus durans* e *Pediococcus pentosaceus* em relação à *Listeria monocytogenes*. 74
- Quadro 4.18.** Caracterização do tipo de actividade antimicrobiana (halos em mm) dos Lactobacilos e *Lc. lactis* ssp. *lactis* contra a *Listeria monocytogenes*. 75
- Quadro 4.19.** Actividade antimicrobiana (halos em mm) dos isolados Lactobacilos em relação ao *Staphylococcus aureus*. 77
- Quadro 4.20.** Actividade antimicrobiana (halos em mm) dos isolados de *Lc. lactis* ssp. *lactis* em relação ao *Staphylococcus aureus*. 77
- Quadro 4.21.** Comparação dos halos de inibição (mm) da actividade antimicrobiana dos isolados das espécies *Enterococcus durans* e *Pediococcus pentosaceus*, para o patógene *Staphylococcus aureus*, em relação aos testes cultura mais meio fresco, cultura e sobrenadante. 78
- Quadro 4.22.** Perfil de sensibilidade a 10 antibióticos, classificando os isolados das BAL em (S) sensíveis, (I) de sensibilidade intermédia e resistentes (R), em função dos valores de referência do CLSI e do CASFM para bactérias pertencentes aos mesmos géneros. 80

Índices de Tabelas

Tabela 3.1. Tabela da referência para as leituras dos antibiogramas, segundo o NCCLS e o CASFM. 48

1. Introdução

Os hábitos alimentares exprimem fortemente a cultura de um povo. A humanidade sempre teve de adaptar a sua alimentação às condições físicas e socioculturais de cada momento. A descoberta da agricultura e das várias vertentes da sua utilização influenciaram marcadamente o sistema alimentar. A domesticação do gado, por exemplo, levou a um uso crescente do leite e de produtos lácteos, e à diversificação do seu consumo.

As bactérias do ácido láctico (BAL) foram isoladas, inicialmente, a partir do leite (Carr *et al.*, 2002), no entanto, ao longo dos tempos, já foram encontradas noutros alimentos e diversos produtos fermentados, tais como, da carne, derivados do leite, hortícolas, bebidas e produtos de panificação (Jay, 2000; O'Sullivan *et al.*, 2002; Liu, 2003). A fermentação de alimentos pelas bactérias lácticas é uma das mais antigas formas de biopreservação praticada pela humanidade. Nesta as matérias-primas são convertidas pelos microrganismos em novos produtos que apresentam qualidades aceitáveis ou mesmo melhoradas enquanto alimentos. As enzimas dos microrganismos desempenham assim frequentemente um papel importante na determinação do sabor e textura finais dos alimentos. Devido a uma procura crescente de bens alimentares com características organolépticas atraentes e microbiologicamente seguros, o desenvolvimento de novos produtos, ou a melhoria dos existentes, tem sido uma constante nos dias de hoje. O alimento lácteo fermentado mais importante é o queijo (Freni *et al.*, 2003). Alguns queijos fabricados com leite cru têm sabores mais intensos do que os queijos da mesma idade feitos a partir de leite pasteurizado. É bem conhecido que as bactérias lácticas “selvagens” provenientes de leite cru estão ligadas à tipicidade destes tipos de queijos, pois são importantes, não só para o desenvolvimento do ácido que acelera a coagulação do leite e auxilia na expulsão do soro de leite, mas também para o sabor, corpo e textura do queijo acabado (Franciosi *et al.*, 2009; Awad *et al.*, 2007). Por esta razão a biodiversidade microbiológica envolvida na produção dos queijos artesanais é considerada como um factor fundamental para suas características típicas (Franciosi *et al.*, 2009).

As comunidades microbianas, com sua fisiologia combinada, interações e actividades enzimáticas, são responsáveis por alterações bioquímicas e nutricionais importantes que ocorrem em substratos de fermentação, de produtos à base de leite (Viljoen, 2001). As bactérias do ácido láctico produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais diversas e desejáveis (Lima *et al.*, 2009).

Um atributo importante de muitas das bactérias lácticas é sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos - as bacteriocinas (Soomro *et al.*, 2002). O antagonismo bacteriano tem sido reconhecido há mais de um século, mas nos últimos anos este fenómeno tem recebido mais atenção científica, nomeadamente pela utilização de várias culturas de bactérias do ácido láctico, ou dos seus produtos, para controlar bactérias patogénicas ou deteriorantes.

Os produtos tradicionais fermentados são ecossistemas complexos, frequentemente desconhecidos, que constituem um manancial de novas estirpes de BAL que podem ser potenciais fontes de genes que codificam novas variantes de, por exemplo, bacteriocinas, proteases e/ou outras enzimas.

O presente trabalho teve como objectivo principal o isolamento e caracterização bioquímica da flora láctica do Queijo São Jorge DOP, contribuindo assim para a conservação e valorização deste património genético único responsável também, em parte, pelas características e tipicidade deste queijo simbólico para os lacticínios dos Açores.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Queijo São Jorge DOP

2.1.1. História

A actividade queijeira em São Jorge deverá ter tido início logo no começo do povoamento da ilha, por portugueses, nos finais do século XV, já que o historiador Gaspar Frutuoso, refere nas *Saudades da Terra* (Livro VI, capítulo 33.º, *Descrição da Ilha de S. Jorge*), que “... há nela muito gado vacum, ovelhum e cabrum, do leite do qual se fazem muitos queijos em todo o ano, o que dizem ser os melhores de todas as ilhas dos Açores, por causa dos pastos...” Os flamengos, também no início da colonização, terão desempenhado um papel importante no desenvolvimento desta actividade na ilha. Presumimos que este queijo terá sido fabricado inicialmente a partir de leite de mistura, de cabra, vaca e ovelha, coagulado pelo coalho vegetal obtido a partir da flor do cardo (*Cynara cardunculus*) o agente coagulante mais utilizado no continente português, espécie também abundante nas ilhas dos Açores. Posteriormente terá evoluído para um queijo de maior dimensão, do tipo Gouda, de vaca, coagulado pelo coalho, fabricado “a frio”, sem aquecimento da coalhada.

Mais tarde, no princípio do século XIX, por influência da família jorgense Cunha da Silveira terão sido introduzidas algumas melhorias tecnológicas na produção de queijo, através da contratação de técnicos estrangeiros, nomeadamente “...de um técnico hamburguês, Fernand Ranchel que, no lugar do Loural se dedicou ao fabrico de um queijo de pasta mais dura...” conhecido pelo nome de “queijo da terra”, sucedâneo dos primeiros tipos de pasta mole e semi-dura até aí usados pela indústria caseira. Sabe-se que há cerca de duzentos anos, o queijo de São Jorge já tinha a forma actual, cilíndrica, volumosa, tipo “roda”, tendo-se chegado a produzir alguns, por encomenda especial, com tais dimensões e peso que eram necessários vários homens para o transportarem (Silveira, 1927).

Mais recentemente o Dr. Francis Patrick Keeting, médico veterinário, um profundo conhecedor da teoria e da prática de fabrico de lacticínios, durante a sua

permanência nos Açores, decidiu estudar o queijo de São Jorge tendo introduzido modificações no seu fabrico, nomeadamente, no aquecimento da coalhada durante o fabrico em cuba, facilitando a sua acidificação e, conseqüentemente, a maturação de longo prazo, modificando então o tipo e a qualidade do queijo de São Jorge, aproximando-o um pouco mais do Cheddar inglês (Silveira, 1927).

Primordialmente, este queijo era fabricado apenas para consumo próprio, mas ao longo de cinco séculos foi adquirindo fama pelas suas qualidades organolépticas únicas, ao ponto de ser já um produto de exportação no fim do século XVI (Gaspar, 2005). Este é assim um queijo de tradição com quase quinhentos anos de evolução, em que as condições edafo-climáticas desta ilha montanhosa, a natureza das suas pastagens, o ambiente sociocultural, a herança de várias tradições, das tecnologias, dos conhecimentos e as cooperativas de freguesia, constituem a parte intrínseca do seu património.

No início do século XX existiam mais de 84 “fábricas” de queijo em São Jorge, e em 1937 contabilizavam-se ainda 40 unidades de transformação (Avelar, 1902; DREPA, 1985; Dias, 1997). Em 2000 existiam apenas 9 cooperativas de produção de queijo. Em 2004, foi criada uma união de cooperativas, UNIQUEIJO (União de Cooperativas Agrícolas de Lacticínios de São Jorge), que tem como principal objectivo a comercialização do Queijo de São Jorge, criando-se as condições para uma estratégia de marketing comum na colocação do produto açoriano no mercado. Actualmente existem três cooperativas, Finisterra (zona Este da ilha), Beira (sudoeste da ilha, Vila das Velas) e dos Lourais (centro da ilha) com produção de queijo com DOP, e uma fábrica privada, Queijo Canada.

Dado às suas características únicas, carácter artesanal e cultura, irrepetíveis noutro espaço, a produção do queijo de São Jorge é regulada a partir de 1986 através de uma Denominação de Origem Protegida (DOP), tendo sido criada a Região Demarcada do Queijo São Jorge, sendo as suas características descritas pelo Decreto Regulamentar Regional nº24/86/A, de 9 de Julho. Foi criada ainda uma confraria, denominada Confraria do Queijo São Jorge, uma entidade sem fins lucrativos, de cariz científico e cultural, à qual foram atribuídas funções de Organismo Privado de Controlo e Certificação do Queijo São Jorge, através da

constituição de uma Câmara de Provedores. Os queijos aprovados pela Câmara de Provedores nos termos da legislação são identificados nas suas duas bases através de rótulos distintos, um impresso a tinta azul, Rótulo DOP Europeu, e um Selo de Garantia, dourado e numerado (Bettencourt, s/d) (Figura 2.1).

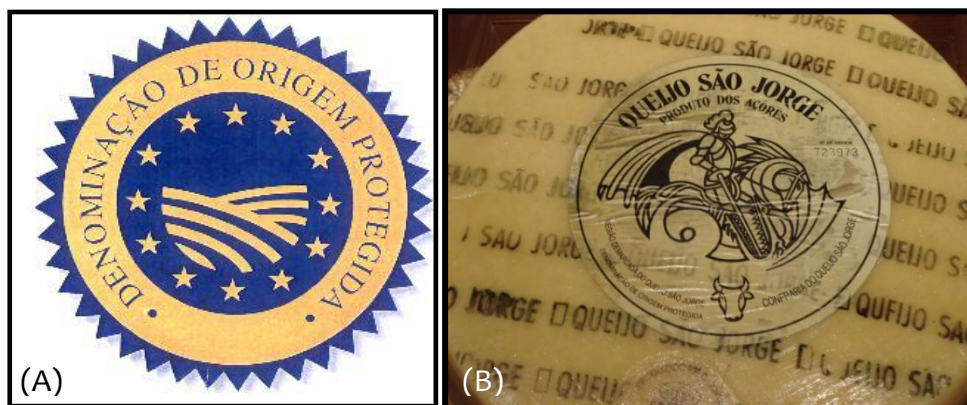


Figura 2.1. (A) Rótulo DOP Europeu (Bettencourt, s/d, <http://www.portais.ws/uniqueijo/>, consultado em Abril de 2011), (B) Rótulo Queijo São Jorge como Selo de Garantia.

2.1.2. Descrição

De acordo com o Decreto Regulamentar Regional nº24/86/A, de 9 de Julho, o Queijo São Jorge apresenta as seguintes características: *“Após a coagulação do leite de vaca inteiro e cru, produzido na ilha de São Jorge, com coalho animal de superior qualidade, o queijo é obtido por dessoramento e prensagem. É curado de consistência firme com uma pasta amarelada, dura ou semi-dura, possuindo olhos pequenos e irregulares disseminados na massa, apresentando uma estrutura ligeiramente quebradiça. Com teor de humidade de 49% a 63% (referida ao queijo isento de matéria gorda (M.G.) e um teor mínimo de M.G. de 45% referida ao resíduo seco, considerando um período mínimo de cura de três meses”*.

“Apresenta uma forma cilíndrica, tipo "roda", com diâmetro entre 25 e 35 cm e a altura entre 10 e 15 cm. O seu peso varia dos 8 aos 12 Kg. A crosta deve ter consistência dura, cor amarelo escuro, por vezes com manchas castanho-avermelhadas e de aspecto liso, bem formada, revestida ou não, de parafina ou de outros revestimentos plásticos adequados e incolores. O seu "flavour" caracteriza-se por ser limpo, ligeiramente picante e "bouquet" forte, particularidades que se acentuam com o seu envelhecimento”.

2.1.3. Leite cru

A qualidade microbiológica e química do leite é um factor muito importante no fabrico do queijo, em especial quando são produzidos a partir do leite cru, ou seja, o leite não é submetido à pasteurização, como é habitual na queijaria tradicional, daí sem a matéria-prima adequada não é possível obter bons derivados. A flora microbiana natural é constituída, por um lado, por bactérias lácticas, responsáveis pela formação do sabor e aromas característicos de cada queijo e por outro lado, pode também conter bactérias patogénicas, como Coliformes, Salmonela, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, entre outras, perigosas para a saúde humana, daí que a higiene no momento da ordenha, o controlo das mamites, a qualidade e rapidez no processo de recolha do leite e os cuidados durante o fabrico do queijo serem muito importantes para o controlo da presença de bactérias indesejáveis (efeito multi-barreiras).

2.1.4. Tecnologia do fabrico do Queijo São Jorge DOP

Pode considerar-se que existe um método padronizado de fabrico de queijo de São Jorge. Segundo Kongo (2010), foram observadas apenas ligeiras variações de procedimentos entre cooperativas, nomeadamente quanto aos tempos indicados para algumas fases do processamento.

De uma forma generalizada o fabrico do Queijo São Jorge DOP pode resumir-se da seguinte forma (Kongo, 2010): quando o leite cru entra na fábrica procede-se à limpeza das impurezas deste e de seguida ao seu aquecimento até 31-32°C. Depois de se atingir a temperatura pretendida, há a adição do soro fermento do dia anterior (1L/1000L) e do coalho animal. Durante a coagulação existe modificações do leite que ocorrem por acção das enzimas proteolíticas (coalho) na presença do ácido láctico produzido por bactérias lácticas (cultura de arranque), fazendo com que o leite coagule. Passado cerca de uma hora ocorre um primeiro corte lento, há uma pausa de dez minutos e de seguida um segundo corte. Ocorre uma agitação, uma cozedura e prensagem de 2 horas e 50 minutos a 35-36°C e, de seguida uma dessora parcial. Neste ponto, quando a acidez é de 19°D, retira-se o soro que será

utilizado em parte como cultura de arranque para o dia seguinte, sendo armazenado à temperatura ambiente (no caso de se verificarem deficiências no soro, é prática pedi-lo à cooperativa mais próxima). Sucede-se a fase de arrefecimento até 30-31°C. Inicia-se depois todo o trabalho manual da coalhada, com o objectivo de obtenção de grãos do tamanho de um grão de milho e acidez final de 30°D. De seguida há a salga, 30g/10L de leite, a moldagem, em formas típicas cobertas por pano fino e a colocação do selo de caseína. Ocorre uma prensagem inicialmente lenta (2 horas) e no final intensa (48 horas). Por fim, temos a fase de maturação do queijo até pelo menos 4 meses, com várias viragens, raspagem final, rotulagem e eventual parafinagem (Figura 2.3). Durante a cura as enzimas das bactérias lácticas actuam sobre a lactose, a caseína e a gordura do leite produzindo substâncias que dão sabor e o aroma ao queijo (Figura 2.2). Antes deste ser comercializado, em torno dos 4 meses de cura, o queijo é submetido a provas organolépticas e a uma preparação e acabamento que asseguram que este chegue ao consumidor com as melhores características.

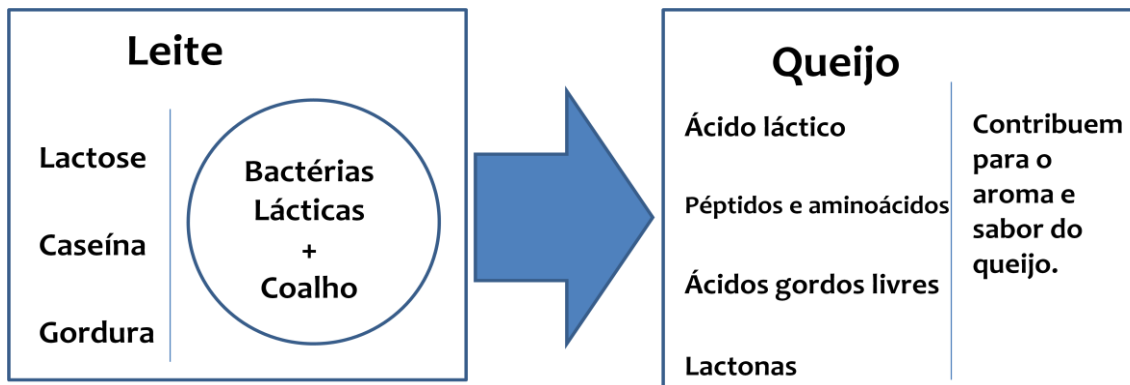


Figura 2.2. Actuação das bactérias do ácido láctico sobre os componentes do leite durante a maturação do queijo e formação de substâncias aromáticas (Adaptado de Kongo, 2010).

1. Leite cru	Limpeza das impurezas do leite - clarificação.
2. Início da coagulação	Aquecimento até 31°-32°C; Adição de soro do dia anterior; Adição de coalho animal(1h).
3. Fim da coagulação	Corte lento (10 min); Segundo corte.
4. Corte da coalhada	Dessora parcial.
5. Agitação e Cozedura	2h 50 min, 35°-36°C, a 19°D.
6. Dessora total e arrefecimento	Até 30°-31°C.
7. Trabalhar manual da coalhada	Obtenção da coalhada com o tamanho de grãos de milho, acidez final de 30°D.
8. Adição de sal à coalhada	30gr/10L de leite.
9. Moldagem	Em formas típicas cobertas por um pano fino; Colocação do selo da caseína.
10. Prensagem	Lenta (2h) Intensa (48h).
Maturação até pelo menos 4 meses	Com várias viragens, raspagem final, rotulagem e eventual parafinação.

Figura 2.3. Diagrama de fluxo do processamento do Queijo São Jorge DOP (Adaptado de Kongo, 2010).

2.2. As Bactérias do Ácido Láctico

2.2.1. Taxonomia

O termo bactéria do ácido láctico (BAL) foi usado como sinónimo de “*milk-souring organism*”. A primeira cultura pura destas bactérias designada na altura de “*Bacterium lactis*” (provavelmente um *Lactococcus lactis*) foi obtida por Lister (1873) (Salminen & Wrigth, 1998). No entanto foi Beijerinck (1901) que descreveu pela primeira vez este grupo bacteriano. O género foi dividido em dois, baseando-se nas suas características fenotípicas, a temperatura óptima de crescimento e a forma de fermentação (Orla-Jensen, 1919). Este mesmo autor Orla-Jensen, com uma razoável precisão, usou as características morfológicas, metabólicas e fisiológicas destas bactérias como critérios para estabelecer a sua diferenciação taxonómica (Inês et al., 2008).

As BAL estão compreendidas pela Ordem Lactobacillales (Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Classe Bacilli). Esta Ordem é por sua vez subdividida em 6 Famílias: Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae e Streptococcaceae, compreendendo mais de 530 espécies e subespécies (Euzéby, 2010). Em que se incluem os Géneros: *Abiotrophia*; *Carnobacterium*; *Enterococcus*; *Lactobacillus*; *Lactococcus*; *Leuconostoc*; *Oenococcus*; *Pediococcus*; *Streptococcus*; *Tetragenococcus*; *Vagococcus*; *Weissella* (Stiles & Holzapfel, 1997; Jay, 2000; Ercolini *et al.*, 2001; Holzapfel *et al.*, 2001; Euzéby, 2010). Contudo, são os Géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* que formam a essência do grupo (Salminen & Wrigth, 1998).

A classificação das BAL, em diferentes grupos, baseia-se na sua morfologia, no modo de fermentação da glucose, do crescimento a diferentes temperaturas, na adaptação a ambientes ricos em nutrientes para produzirem ácido láctico, na habilidade de crescer em altas concentrações de sal (NaCl) e o facto de apresentem tolerância a meios ácidos ou alcalinos (Salminen & Wrigth, 1998). Com o desenvolvimento das ferramentas moleculares e da caracterização genética, a sua nomenclatura tem sido reordenada, novos grupos têm sido identificados, com base no gene 16S rRNA (Collins *et al.*, 1991).

De notar que, existem outros microrganismos Gram positivos produtores de ácido láctico, mas pertencentes ao Filo Actinobacteria, com os Géneros *Aerococcus*, *Microbacterium* e *Propionibacterium* (Sneath & Holt, 2001); bem como *Bifidobacterium* (Gibson & Fuller, 2000; Holzapfel *et al.*, 2001).

2.2.2. Caracterização

As BAL são um grupo morfológicamente heterogéneo, com cocos e bacilos, que podem estar dispostos em cadeia ou individualmente, Gram positivas, não esporuladas, catalase negativas, anaeróbicas facultativas, capazes de realizar a fermentação em anaerobiose, bem como em aerobiose, mas de uma forma mais lenta. Produzem o ácido láctico, como o principal produto final da fermentação dos açúcares, estando envolvidas na acidificação dos produtos alimentares destinados quer a humanos, quer a animais (Salminen & Wrigth, 1998). São microrganismos

quimioorganotróficos com metabolismo estritamente fermentativo. A característica chave deste grupo é a incapacidade de sintetizar grupos porfirínicos (e.g. heme), o que explica o facto de, nas condições de cultura utilizadas em laboratório, as lácticas serem desprovidas de citocromos e da “verdadeira” catalase. Contudo, podem ocorrer excepções a esta descrição geral, já que algumas destas estirpes produzem peroxidases ou uma “pseudocatalase”. Em meios contendo hematina ou compostos similares, algumas estirpes podem produzir catalase ou mesmo citocromos, e em alguns casos constituir uma cadeia de transporte electrolítico funcional (Inês *et al.*, 2008).

As bactérias lácticas são essencialmente mesófilas, com algumas linhagens termófilas, sendo capazes de crescer num intervalo de temperaturas de 5 a 45°C. Têm a capacidade de crescer a pH de 3,8 e são proteolíticas fastidiosas em relação a alguns aminoácidos. Produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (Lima *et al.*, 2009). Também produzem vários factores antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio, nisinas, bacteriocinas diacetilo e acetaldeído (Forsythe, 2002), que actuam favoravelmente nos produtos alimentares, fazendo parte dos microrganismos capazes de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro (Lima *et al.*, 2009). Algumas BAL podem ainda ser usadas por secretarem exopolissacarídeos, influenciando a textura dos alimentos quando tal for desejável (Chammas *et al.*, 2006).

As bactérias lácticas são importantes na produção queijeira, uma vez que, promovem o desenvolvimento do ácido láctico que, acelera a coagulação do leite, auxiliando na sinérese do soro, contribuindo ainda para o sabor, corpo e textura do queijo acabado (Awad *et al.*, 2007). Durante o fabrico e maturação do queijo, a composição da microflora láctica sofre várias alterações, de acordo com as modificações das condições ambientais, que frequentemente fornecem stress celular, como choque térmico, pH adversos, redução do potencial de oxidação-redução, diminuição da actividade da água e exaustão dos nutrientes (Di Cagno *et al.*, 2006).

2.2.3. Fermentação

A fermentação da lactose, em ácido láctico e em outros produtos finais do metabolismo das bactérias do ácido láctico é a chave para a produção da maioria dos queijos e de outros produtos fermentados do leite. O ácido láctico tem a capacidade de agir como um conservante durante o processo de fabrico e do produto final, baixando o pH da matéria-prima, aproximadamente de 6,6 para 4 no caso do iogurte, e para 4,6, ou mais baixo ainda, no caso dos queijos e outros produtos lácteos. Nestes produtos a fermentação láctica é normalmente mediada por diferentes culturas de bactérias lácticas, que têm a capacidade de começar a produção de ácido no leite (Cogan & Accolas, 1990).

A fermentação pode ocorrer por duas vias: a homoláctica, se o ácido láctico é o único produto formado; e a heteroláctica, quando se formam outros produtos para além do ácido láctico como, ácido acético, etanol, CO₂, etc. (Caplice & Fitzgerald, 1999; Jay, 2000; Kuipers *et al.*, 2000). Assim, dependendo do microrganismo, podemos ter vias metabólicas diferentes: a via homofermentativa, em que uma molécula de glucose resulta em dois lactatos; enquanto na via heterofermentativa, uma molécula de glucose é transformada em etanol e ácido láctico (Forsythe, 2002) (Quadro 2.1). Além disso as BAL conseguem produzir ainda, embora em menores quantidades, outros compostos orgânicos responsáveis pelo aroma e o sabor ao produto fermentado (Caplice & Fitzgerald, 1999) (Figura 2.4).

Quadro 2.1. Grupos de bactérias do ácido láctico e o seu tipo de fermentação (Adaptado de Forsythe, 2002).

Tipo de fermentação	Principais produtos	Isómero do lactato	Organismos
Homofermentativa	Lactato	L (+)	<i>Lactobacillus bavaricus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Homofermentativa	Lactato	DL, L (+)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Homofermentativa	Lactato	DL (-), L(+), DL	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Heterofermentativa	Lactato, etanol, CO ₂	DL	<i>Lactobacillus brevis</i>
Heterofermentativa	Lactato, etanol, CO ₂	D (-)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

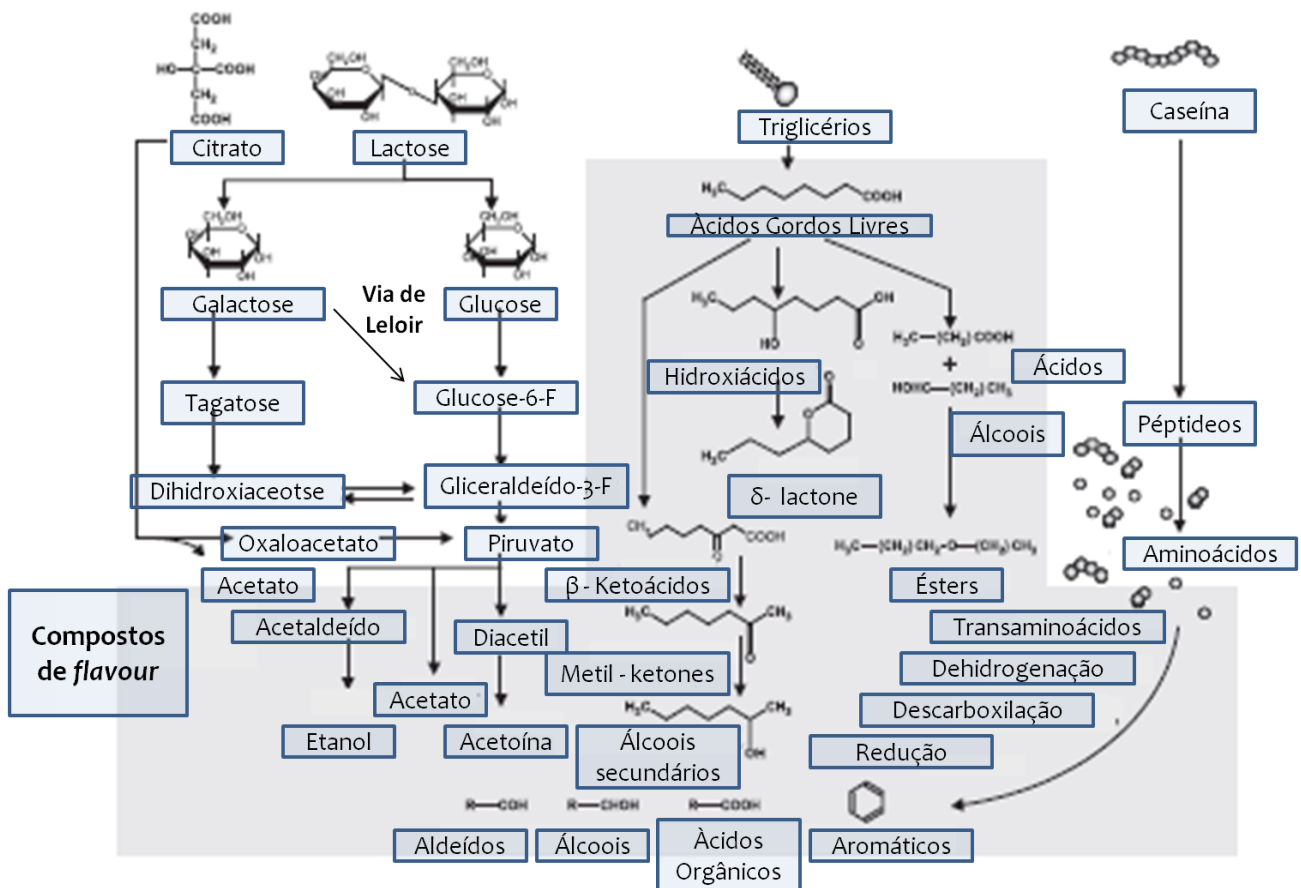


Figura 2.4. Produtos responsáveis pela formação de *flavours* no queijo: vias metabólicas (Adaptado de Mariley & Casey, 2004).

2.2.3.1. Via Homofermentativa

Nas bactérias homofermentativas, ocorre inicialmente a fosforilação da glucose e posteriormente da frutose-6-fosfato, originando frutose-1-6-difosfato, que é cindida através da frutose-1,6-difosfato-aldolase em duas trioses interconvertíveis, a di-hidroxiacetonafosfato e o gliceraldeído-3-fosfato. Este último é oxidado a 1,3-difosfoglicerato que, por um conjunto de reacções que envolve cinase, mutase e enolase, origina o piruvato. Neste caso, o piruvato funciona como receptor final de electrões gerados na oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, reduzindo-se a lactato. Os isómeros de ácido láctico produzidos (L (+) e D (-)) surgem como resultado da estereoespecificidade da lactato-desidrogenase presente na célula, constituindo parâmetros particularmente importantes na identificação das BAL. A forma racémica (DL) também pode ser formada quando estão presentes as enzimas na célula: D- e L-lactatodesidrogenase; ou mais raramente, pela acção de uma L-lactato-racemase induzida, em combinação com uma L-lactato-desidrogenase (Inês *et al.*, 2008), (ver Figura 2.5).

2.2.3.2. Via Heterofermentativa

Nas bactérias heterofermentativas, a glucose fosforilada, é oxidada a 6-fosfogluconato que, por uma descarboxilação oxidativa, origina ribulose-5- fosfato. Até este momento do processo metabólico, estão formadas uma mole de CO₂ e duas moles de coenzima A e NADH⁺ reduzido. Por meio de uma epimerização a ribulose-5-fosfato é convertida em xilulose-5-fosfato, que é posteriormente cindida em gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato, pela xilulose- 5-fosfato-fosfocetolase. O gliceraldeído-3-fosfato é metabolizado do mesmo modo que na via glicolítica referida para as bactérias homofermentativas, resultando uma mole de lactato e uma de ATP. O acetil-fosfato é reduzido a etanol via acetil-CoA e acetaldeído. Muitas estirpes de bactérias heterofermentativas podem usar o oxigénio como receptor de electrões, através de uma flavoproteína, produzindo a partir da fermentação da glucose, CO₂, acetato e lactato, como produtos finais o que se traduz num

acréscimo de ATP formado na conversão de acetil-fosfato a acetato (Inês et al., 2008), (ver Figura 2.5).

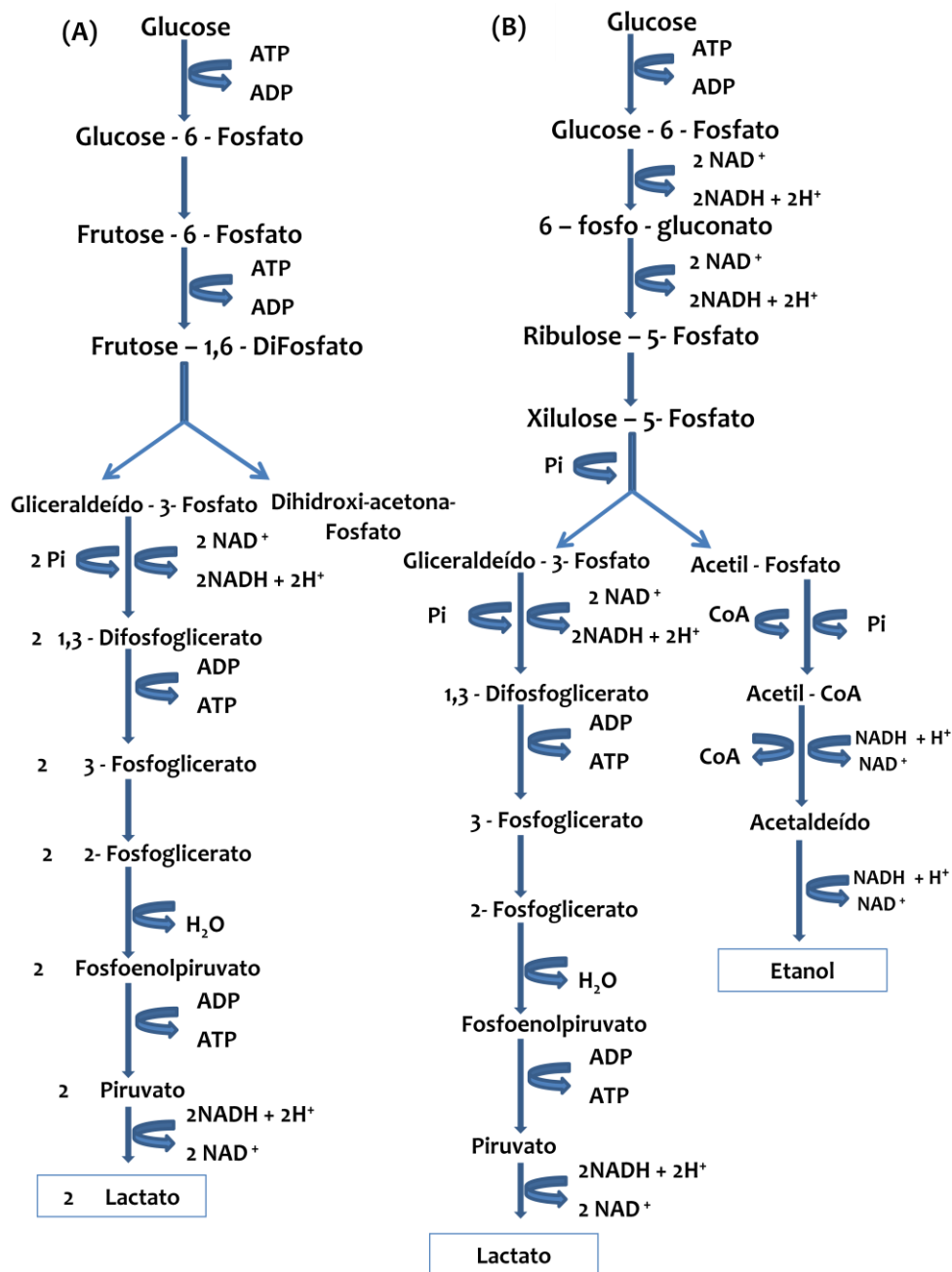


Figura 2.5. Vias de fermentação da glicose. (A) Via Homofermentativa; (B) Via Heterofermentativa (Adaptado de Salminen & Wrigth, 1998).

2.2.3.3. Metabolismo da Lactose

A lactose (um dissacarídeo) é um dos principais açúcares do leite utilizado pelas BAL no seu metabolismo. A sua absorção é facilitada pela presença duma

permease nestas bactérias, via sistema fosfotransferase fosfolpiruvato-dependente (PTS). A molécula de lactose é clivada produzindo galactose (ou galactose-6-fosfato) e glucose (pronta a iniciar o ciclo do metabolismo da glucose). Por sua vez, a galactose sofre uma fosforilação formando diacetilhidroxiacetona, que acaba por entrar no metabolismo da glucose, via homo ou heterofermentativa (Figura 2.6).

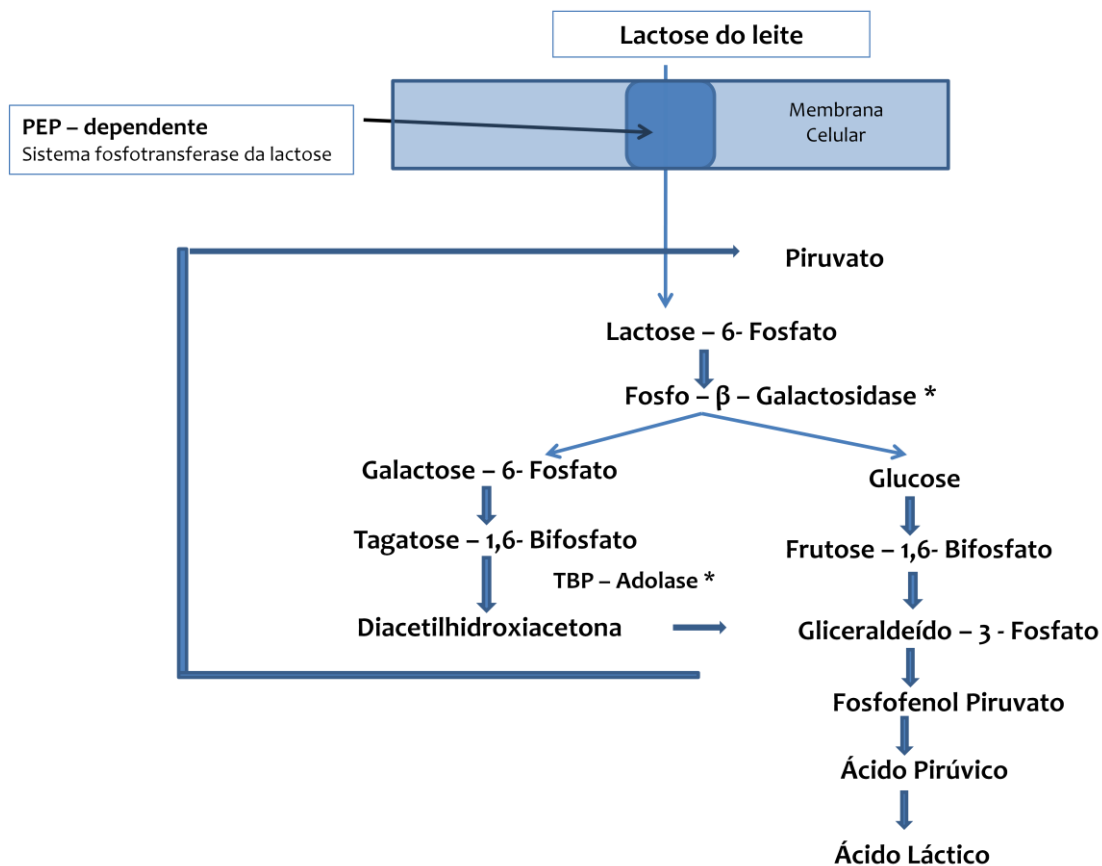


Figura 2.6. Metabolismo da lactose (Adaptado de Forsythe, 2002).

2.2.3.4. Fermentação de outros Açúcares

Para além da glucose e da lactose, outros açúcares são metabolizados pelas BAL, nomeadamente, frutose, manose, sacarose, maltose e pentoses. A maior parte das hexoses são transportadas por permeases (ATP dependentes) e/ou pelo sistema da fosfotransferase (fosfoenolpiruvato-dependente) e são metabolizadas pelas vias descritas anteriormente, após isomerização e/ou fosforilação. Relativamente às pentoses, quase todas as estirpes heterofermentativas têm capacidade de as utilizar, embora existam algumas pentose-negativas. Estas são

geralmente transportadas para o interior da célula através de permeases. No interior, são fosforiladas e convertidas a D-xilulose- 5-fosfato por epimerases e/ou isomerases. Este composto dá origem a quantidades equimolares de lactato e acetato, pelas reacções que ocorrem na parte final da via heterofermentativa, anteriormente descrita (Inês *et al.*, 2008).

2.2.4. Sistema Proteolítico das BAL

A proteólise é um pré-requisito para o crescimento das bactérias lácticas e a subsequente degradação das proteínas do leite (caseína), originando a libertação de peptídeos curtos e aminoácidos livres (Forsythe, 2002; Moulay *et al.*, 2006), tendo este efeito, uma grande importância na maturação dos queijos e no desenvolvimento do sabor, aroma e textura característico do produto acabado (Forsythe, 2002). Algumas espécies lácticas possuem a via deiminase da arginina - por *e.g.* *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Manca de Nadra *et al.*, 1988) e algumas espécies homo e heterofermentativas de *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Liu *et al.*, 2003) conseguem converter a arginina em ornitina. Além destas, o *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* consegue sintetizar o aspartato a partir do oxaloacetato, através da via de transaminação (Marty-Teyssset *et al.*, 1996). Um grande número de bactérias do ácido láctico produz a glicina através da treonina (Lees & Jago, 1976).

Os componentes estruturais do sistema proteolítico podem ser divididos em três grupos, com base nas suas funções: (1) as proteinases que quebram as proteínas em peptídeos; (2) um sistema de transporte que conduz estes produtos através da membrana citoplasmática; (3) peptidases que degradam peptídeos em aminoácidos livres (Figura 2.7). Estes aminoácidos irão ser degradados por uma via metabólica dependente que irá produzir compostos voláteis responsáveis pelo aroma dos produtos alimentares fermentados (Mayo *et al.*, 2010).

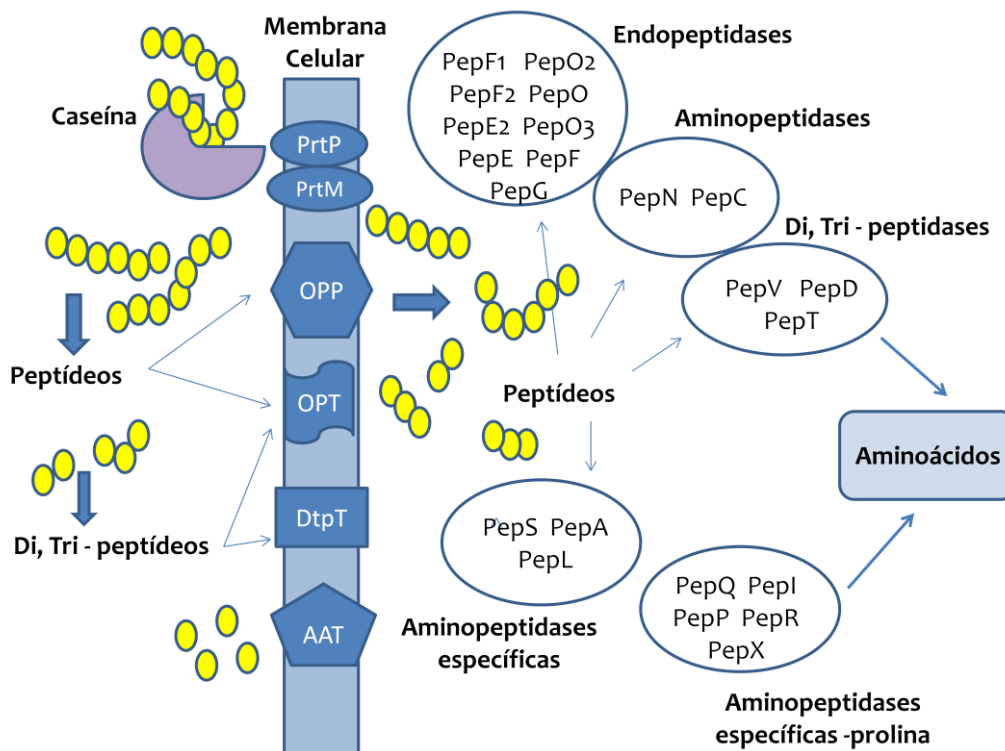


Figura 2.7. Metabolismo Proteolítico das bactérias do ácido láctico. O pentágono AAT refere-se aos diferentes tipos, cerca de 14, transportadores de aminoácidos. A acção e a especificidade das peptidases, mais o esquema dos péptídeos são indicadas por setas (Adaptado de Mayo et al., 2010).

Nas paredes das células bacterianas existe uma protease extracelular ligada, que geralmente é responsável pelo início da quebra das moléculas de caseína (Figura 2.7). Estudos recentes mostraram que as lácticas não conseguem crescer no leite na ausência da proteinase extracelular funcional. Esta enzima é uma serinoprotease que pertence à família subtilisina (Siezen, 1999). No geral, as lácticas apenas possuem uma proteinase extracelular, mas a presença de duas desta enzima já foi descoberta em alguns lactobacilos (Pederson et al., 1999). A existência de uma lipoproteína ligada à membrana, PrtM (Figura 2.7), é essencial para a activação autocatalítica da proteinase em algumas bactérias, como *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus paracasei* (Haandrikman et al., 1991).

O segundo passo do metabolismo é o transporte de di-, tri-, e oligo-peptídeos para o interior da célula, através da acção de diferentes sistemas de absorção de peptídeos. Três sistemas funcionais de transporte de peptídeos foram descritos no *Lactococcus lactis*: DtpT, Opp e o Opt (Mayo et al., 2010) (Figura 2.7). O DtpT é um protão transportador dependente de uma força motriz, que é

especificamente limitado para o transporte de di- e tri-peptídeos, que já foi também encontrado em diferentes espécies de lactobacilos e em *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. Os sistemas Opp e Opt são transportadores que pertencem à superfamília do Transporte ABC, que transportem di-, tri-, e oligopeptídeos. Também já foram encontrados em diferentes espécies de lactobacilos e em *Leuconostoc mesenteroides* (Detmers *et al.*, 1998).

No interior das células bacterianas, os peptídeos são degradados através da acção de uma matriz de peptidases que os distingue por uma sobreposição de especificidades (Kunji *et al.*, 1996a) (Figura 2.7). As peptidases podem ser divididas em dois tipos: 1- as endopeptidases, que hidrolisam as ligações peptídicas internas e; 2- as exopeptidases, que removem os aminoácidos do extremo da cadeia peptídica. Nas BAL a maioria das exopeptidases são aminopeptidases e a sua especificidade depende do comprimento do peptídeo e da natureza do resíduo N-terminal do aminoácido (Kunji *et al.*, 1996b).

2.2.4.1. Catabolismo dos Aminoácidos e a Formação do *Flavour*

O catabolismo dos aminoácidos tem implicações no que respeita à qualidade (formação do *flavour*) e à segurança (síntese de amins biogénicas) de produtos fermentados. Acredita-se que este catabolismo é importante para as bactérias do ácido láctico, para a obtenção de energia quando há limitações de nutrientes no meio, participando na homeostasia do pH (Mayo *et al.*, 2010). Contudo, para as bactérias do ácido láctico, a maioria das vias estão parcialmente caracterizadas. A valina, isoleucina e a leucina (BCAAs), os aminoácidos aromáticos, como a tirosina, o triptofano e a fenilalanina, os que contêm enxofre, como a metionina e a cisteína, e a treonina são os responsáveis pelo *flavour* do produto (Figura 2.8). Também existem outros aminoácidos que estão envolvidos na produção de acetoína e diacetilo, como foi demonstrado no catabolismo do ácido aspártico (Le Bars & Yvon, 2008).

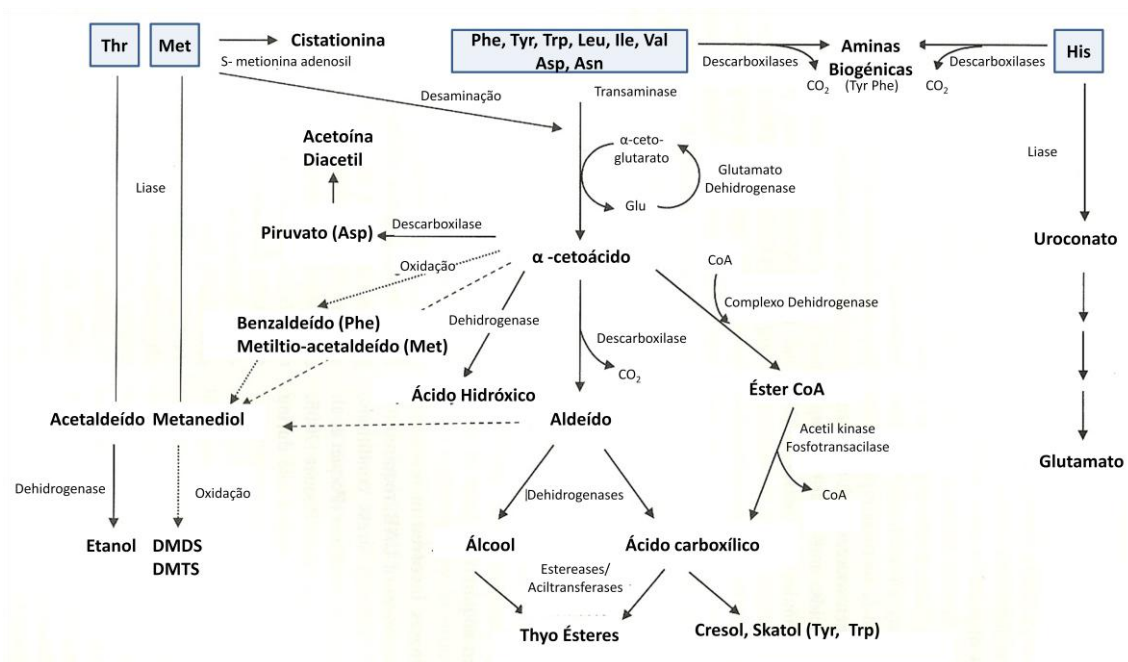


Figura 2.8. Vias Catabólicas dos principais aminoácidos envolvidos na produção dos compostos aromáticos. As linhas contínuas mostram as reacções enzimáticas catalisadas através das enzimas indicadas. As linhas pontilhadas e quebradas mostram as reacções químicas espontâneas e as vias mal definidas, respectivamente. Os compostos formados mais importantes encontram-se a negrito (Adaptado de Mayo *et al.*, 2010).

Os BCAAs são aminoácidos que contêm enxofre, podendo ser degradados através de duas vias: transaminação e degradação (Figura 2.8). Duas estirpes lácticas que possuem a capacidade de utilizar estes aminoácidos são especialmente o *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* e *Lactobacillus fermentum* (Liu *et al.*, 2003). A transaminação pode ser catalisada através de duas aminotransferases, BcaT e AraT (Yvon & Rijnen, 2001), que convertem os aminoácidos nos seus correspondentes α -cetoácidos. Os ortólogos (genes que evoluem de forma divergente entre espécies) da aminotransferase, BcaT, estão presentes em todas as espécies de lactococos e estreptococos, enquanto estão ausentes num grande número de lactobacilos. O gene da aminotransferase, AraT, está presente em quase todas as espécies bacterianas das BAL, à excepção de duas, *Lactobacillus sakei* e o *Lactobacillus brevis*. A reacção de transaminação está frequentemente ligada a uma desaminação do glutamato a α -cetoglutarato, catalisada através da enzima dehidrogenase (GDH). A actividade da GDH varia conforme as BAL faltando na maioria dos *Lactococcus lactis*, (Lapujade *et al.*, 1998), encontrando-se presente na maioria dos *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (Helinck *et al.*, 2004). No caso

dos lactobacilos a actividade da GDH também depende da espécie (Kieronczyk et al., 2003).

Os α -cetoácidos podem ser convertidos em aldeídos, ácidos carboxílicos e em hidroácidos em três formas diferentes: através da descarboxilação oxidativa, para os ácidos carboxílicos, da descarboxilação, para os aldeídos, e através da redução para os hidroxiácidos (Figura 2.8). Os α -cetoácidos podem ser descarboxilados a aldeídos, através de α -cetoácidos descarboxilases. Nas lácticas esta actividade foi encontrada nos *Lactococcus lactis* var. *maltigenes*, no *Lactobacillus casei* e nos *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* (Helinck et al., 2004). A descarboxilação oxidativa dos BACCs não é comum nas BAL. Esta reacção leva à formação de ácidos carboxílicos, sem a formação transitória de aldeídos. Primeiramente, os α -cetoácidos são descarboxilados nos seus correspondentes acetil-CoA, através do α -cetoácido dehidrogenase (KaDH), uma enzima complexa, formada por quatro subunidades. Depois, o acetil-CoA é convertido nos respectivos ácidos carboxílicos, através da fosfotransacilase e da acilquinase (ACK) (Liu et al., 2008).

Os α -cetoácidos também podem ser reduzidos a hidroxiácidos através da hidroxiácido dehidrogenase (HADH). Existem duas hidroxiácidos desidrogenases esteroespecíficas, D-HADH e L-HADH, distintas, que pertencem à família da proteína D-LDH e L-LDH, respectivamente. Contudo, não podemos afirmar que os hidroxiácidos estão directamente relacionados com a formação de *flavour*. O facto dos hidroxiácidos, e alguns compostos do *flavour* compartilharem alguns precursores implica que a actividade da HADH possa ter efeitos negativos na formação do *flavour*, através do desvio dos precursores deste a *off-flavours* (Mayo et al., 2010).

A ADH e a aldeído-dehidrogenase (ALDH) catalisam a conversão dos aldeídos a álcoois e a ácidos carboxílicos, respectivamente. A maioria dos genomas das BAL codificam múltiplos membros da ADH, mas existe apenas um único ortólogo ADH/ALDH, no entanto, estas actividades nunca foram estudadas (Mayo et al., 2010).

2.2.4.2. Metionina, Cisteína e Treonina

Os compostos produzidos com enxofre a partir do catabolismo dos aminoácidos, são potenciais odorantes em muitos produtos fermentados. Este metabolismo é complexo, pois há que considerar a existência de múltiplas vias, enzimas, a distribuição das espécies e linhagens destas actividades. A metionina pode ser metabolizada por 3 vias: (1) conversão a cistationina - primeiro a homocisteína, pela adenosil homocisteinase e depois esta a cistationina pela Cistationina -sintase vinculando assim os pólos da metionina e da cisteína, (2) a sua desaminação a α -oxo- γ -metilciobutirato, através da acção de uma aminotransferase, (3) e pela desaminação e detiometilação simultânea para metanetiol, através da metionina liase (Figura 2.8). A conversão de metionina a metaneciol via liase pode ser catalisada através de três enzimas PLP-dependentes: cistationina β -liase (CBL), cistationina γ -liase (CGL) e a metionina γ -liase (MGL). A MGL encontra-se amplamente distribuída na maioria das bactérias mas, ainda não foi identificada nas BAL. As CBL e CGL podem usar vários substratos que contêm enxofre incluindo a metionina para produzir metaneciol via α - e γ - eliminação. Os genes destas duas enzimas já foram identificados no genoma das BAL, mas estas liases têm possivelmente um papel menor na degradação da metionina, pelo menos no *Lactococcus lactis* (Fernández *et al.*, 2000). A metionina também pode ser degradada via transaminação (Figura 2.8) e o produto resultante, o ácido 2-ceto-4-metiltiobutírico (KMBA), pode ser sequencialmente transformado em metanotiol ou metil mercaptano (composto com odor muito forte, a couve podre, característico dos queijos Limburger, Muenster e outros, pela acção da bactéria *Brevibacterium linens*) através de uma via desconhecida (Yvon & Rijnen, 2001). O KMBA pode ser quimicamente convertido em metiltioaldeído, metanotiol, e sulfureto de dimetilo. O metanodiol pode ser auto-oxidado a sulfureto de dimetil e a trissulfureto de dimetil (Figura 2.8). Contudo, o KMBA pode ser degradado a metanotiol e em ácido 2-hidroxil-4-metiltiobutirico por algumas estirpes de lactococos através das vias enzimáticas (Hanniffy *et al.*, 2009).

Muitos estudos sobre os aminoácidos têm mostrado que a maioria das BAL podem utilizar a cisteína, contudo esta capacidade é dependente da espécie

(Williams *et al.*, 2001). Também foi mencionado que a enzima CGL consegue degradar a cisteína e a cistina em amónia, sulfureto hidrogenado e piruvato (Bruinenberg *et al.*, 1997). Por outro lado, a cisteína pode ser utilizada para a biossíntese de metionina via cistationina, que pode ser degradada sequencialmente (Mayo *et al.*, 2010).

A treonina pode ser degradada a acetoaldeído (Figura 2.8), o maior componente do *flavour* do iogurte. A treonina aldolase tem sido descrita como a chave da via catabólica da treonina das BAL (Christensen *et al.*, 1999). Esta enzima catalisa a divisão da treonina em acetoaldeído e em glicina. A actividade da treonina aldolase será devida a duas enzimas diferentes, nomeadamente, serina hidroximetiltransferase (SHMT) e a treonina aldolase com especificidade baixa (LTA). A codificação dos genes da SHMT está presente em todos os genomas das bactérias do ácido láctico, enquanto os genes da enzima LTA ainda não foram identificados. Estudos bioquímicos e genéticos têm demonstrado que a treonina aldolase das BAL se deve possivelmente à presença de uma SHMT (Chaves *et al.*, 2002). A treonina também pode ser desaminada a 2-oxobutanoato, composto precursor para a biosíntese dos BCAAs. Este facto tem sido demonstrado nas estirpes *Lc. lactis*, *Streptococcus*, *Lb. casei*, *Lb. sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus pentosaceus* (Mayo *et al.*, 2010).

2.2.4.3. Vias das amino biogénicas a partir dos aminoácidos

Do catabolismo de alguns aminoácidos pode resultar a produção de algumas aminas biogénicas (BAs), que podem causar intoxicações alimentares. As BAs são normalmente formadas pela descarboxilação de amoniácidos como, tirosina, histidina e ornitina (Figura 2.8), em que é produzido respectivamente, tiramina, histamina, cadaverina e putrescina. A descarboxilação da tirosina, histidina e ornitina tem sido referida nas BAL, como, algumas espécies de *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* e *Carnobacterium* (Mayo *et al.*, 2010).

A descarboxilação da arginina (ADC) converte a arginina em agmatina, esta actividade foi apenas demonstrada no *Lb. hilgardii* X1B (Arena & Manca de Nadra, 2001). Além disso, muitas lácticas usam a agmatina pelas vias agmatina deiminase,

putrescina carboiltransferase e carbamato-quinase. A via agmatina deiminase foi observada pela primeira vez em *Enterococcus faecalis* (Simon & Stalon, 1982). Análises genómicas e os resultados de Lucas *et al.*, (2007) revelam a presença de genes de agmatina deiminase em diferentes estirpes de *Lb. brevis*, *Lb. sakei* e *Pediococcus pentosaceus*.

2.2.4.4. Metabolismo da Arginina

O metabolismo da arginina tem sido estudado nas bactérias do ácido láctico, contudo não se encontra envolvido na formação do *flavour* e das aminas biogénicas. A via mais comum do catabolismo da arginina é a via arginina desaminase (ADI). Esta via compreende três reacções catalisadas pela ADI, ornitina carbamoil-transferase e pela carbamato-quinase (Fernández & Zúñiga, 2006). A degradação da arginina, através da via ADI, resulta na produção de ATP e amónia. Desta via resulta energia e protecção contra o pH ácido extremo. Sendo assim, importante como fonte de energia e/ou como um sistema protector contra ambientes ácidos para as BAL. De uma forma geral, a arginina induz a produção das enzimas ADI e alguns carboidratos reprimem a sua síntese, sendo controlada através da repressão catabólita (Mayo *et al.*, 2010).

2.2.5. Metabolismo do Citrato e a formação de compostos aromáticos

Quantidades consideráveis de citrato (130-160 mg por 100 ml) ocorrem no leite de vaca, ovelha e cabra. Para além dos açúcares, muitas espécies de bactérias lácticas têm a capacidade de metabolizar o citrato, um processo que requer o seu transporte, a sua conversão a oxaloacetato, e depois a piruvato e libertação de CO₂, sendo que a concentração de Mn₂⁺ influencia esta utilização (Figura 2.9). A fermentação do citrato pelas BAL leva à produção de compostos de 4 carbonos (C₄), nomeadamente, diacetilo, acetoína e butanediol, que possuem propriedades aromáticas e são importantes para o aroma típico de muitos produtos lácteos. As espécies de *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (*Lc. diacetylactis*) e de *Leuconostoc* e *Weissella* são usadas pela fermentação industrial como produtores de

diacetilo. Outras BAL, como os *Lb. plantarum* e *Oenococcus oeni*, utilizam a presença do citrato para produzir uma fermentação secundária no vinho, na cerveja e em salsichas, que conferem *off-flavours* a esses produtos. Assim, quer seja pelos seus efeitos benéficos ou prejudiciais há um grande interesse industrial pelo metabolismo do citrato pelas BAL (Mayo *et al.*, 2010).

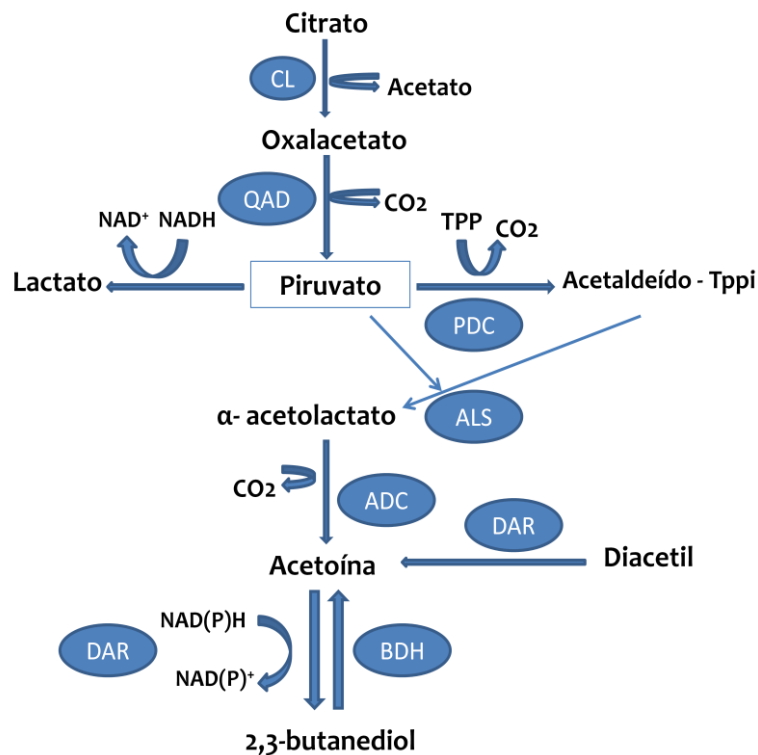


Figura 2.9. Metabolismo do Citrato em estirpes de *Lactococcus* e *Leuconostoc* (Adaptado de Mayo *et al.*, 2010).

Chave das enzimas: CL, citrato liase; QAD, oxaloacetato descarboxilase; LDH, lactato desidrogenase; PDC, piruvato descarboxilase; ALS, α -acetolactato sintase; ADC, α -acetolactato descarboxilase; DAR, acetoina diacetil reductase; BDH, 2,3-butanediol desidrogenase, Tppi, tiamina pirofosfato.

2.2.5.1. Transporte do Citrato

O transporte do citrato é realizado através de permeases específicas associadas à membrana, e constitui um factor limitante da utilização do citrato. A caracterização bioquímica das permeases tem mostrado que o citrato pode ser incorporado através de diversos mecanismos. A maioria das espécies lácticas internaliza o citrato através de um tipo de transportador o 2-hidroxicarboxilato, que transporta ácidos dicarboxílicos e tricarboxílicos (Sobczak & Lolkema, 2005). Entre

os transportadores de citrato desta família, os melhores caracterizados nas bactérias são CitS e o CitP principalmente os do *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*. O CitS é um *simporter*, que usa Na^{2+} como gradiente para o transporte do citrato, porém, o CitP é responsável pelo *antiport* de H-citartyo^{2-} e lactato^{1-} que geram um potencial de membrana (Drider *et al.*, 2004).

2.2.5.2. Conversão do Citrato a Piruvato

Uma vez no interior da célula, o citrato é convertido em acetato e oxaloacetato, numa reacção catalisada através da enzima citrato liase (CL). Esta é um complexo enzimático, que catalisa a conversão do citrato em um processo de multi-reacção e já foi purificada a partir da estirpe *Leuconostoc mesenteroides* (Bekal *et al.*, 1998) e do *Lc. diacetylactis* CRL264 (Martín *et al.*, 2004).

O segundo passo, do metabolismo do citrato é a catalisação através da oxaloacetato descarboxilase (OAD), isto é, a descarboxilação do oxaloacetato, originando piruvato e CO_2 (Figura 2.9).

2.2.5.3. Conversão do Piruvato a Compostos Aromáticos

O metabolismo do piruvato, nas BAL, pode produzir diferentes produtos finais, como o lactato, formato, acetato, etanol e compostos aromáticos de 4 carbonos diacetilo, acetoína e butanediol (Neves *et al.*, 2005) (Figura 2.9). A via biossintética metabólica do citrato a diacetilo foi demonstrada por Ramos *et al.*, (1994), utilizando a estirpe *Lactococcus diacetylactis*, em que a síntese do diacetilo é uma via intermediária do α -acetolactato (Figura 2.9). A síntese do α -acetolactato (ALS) é a enzima chave para a síntese dos compostos C4, através da catalisação da condensação de duas moléculas de piruvato para formar α -acetolactato. Uma vez formada, esta molécula instável é prontamente descarboxilada a acetoína, através da descarboxilase α -acetolactato (ALD), ou a diacetilo, através de uma descarboxilação não enzimática (na presença do oxigénio). A acetoína pode ser sintetizada a partir do diacetilo através da diacetilo redutase (DAR), esta enzima também possui a actividade acetoína redutase, cedendo o 2, 3 butanediol a partir da

acetoína, enquanto a reacção reversa é catalisada através do 2, 3 butanediol dehidrogenase (BDH) (Figura 2.9). O balanço dos produtos finais da fermentação do citrato depende do estado redox das células (Bassit *et al.*, 1993).

2.2.6. Sistema Lipolítico das bactérias lácticas

O queijo é um alimento rico em gordura, e esta fracção gorda é importante para o desenvolvimento do *flavour* e da textura típica. É sabido que um maior teor de gordura leva a uma menor firmeza do queijo e a um corpo mais elástico, enquanto os produtos com baixo teor de gordura tendem a ser mais quebradiços e menos suaves (Emmons *et al.*, 1980).

Os níveis elevados de gordura nos alimentos levam a mudanças lipolíticas (hidrólises enzimáticas através de lipases e esterases) e oxidativas (químicas) que são prováveis de ocorrer no queijo. A hidrólise dos triglicéridos, que constituem mais de 98% da gordura do queijo, é a principal transformação bioquímica durante o catabolismo da gordura, o que leva à produção de ácidos gordos livres (FFA), di- e monoglicéridos e a possibilidade de colesterol. Os FFA contribuem para o aroma do queijo, contudo entre o C4:0 e C12:0 são específicos para o *flavour* do queijo. A intensidade do *flavour* não depende apenas da concentração de FFA, mas também, na sua distribuição entre as fases aquosa e gorda, do pH do meio, na presença de alguns catiões, como Na⁺ e Ca²⁺, e dos produtos resultantes da degradação das proteínas (Adda *et al.*, 1982).

As BAL apresentam uma capacidade lipolítica baixa, uma vez que produzem baixos níveis de FFA, contribuindo assim pouco para este metabolismo e para o *flavour* do queijo associado aos derivados da gordura (Olson, 1990). As lipases presentes no leite, provenientes de bactérias “starters” e não “starters”, são absorvidas nos glóbulos de gordura, e são incorporadas na coalhada do queijo, onde mais tarde podem causar o ranço deste produto durante a sua maturação (Fox, 1989). Por outro lado, as lipases do leite são mais activas que as lipases originadas pelas culturas de arranque (Reiter & Sharpe, 1971). A lipase do leite hidrolisa selectivamente a gordura e também é capaz de interagir com os triglicéridos, enquanto as lipases dos lactococos activas interagem com os di- e

monoglicéridos (Stadhouders & Veringa, 1973). A actividade das lipases e das esterases foram detectadas em espécies de *Lactococcus* e *Lactobacillus* (Kamaly & Marth, 1989), e a preferência por cadeias curtas de ácidos gordos foi observada nas espécies de lactococos (El-Soda *et al.*, 1986).

Contudo, há alguns anos tem havido uma maior atenção sobre os ácidos gordos conjugados, como os lípidos funcionais biologicamente benéfico. Alguns isómeros de ácido linoleico conjugado (CLA) reduzem a carcinogénese, a aterosclorose e a gordura corporal. O uso de algumas reacções biológicas pela produção de CLA poderá ser uma resposta. Segundo Ogawa *et al.*, (2005) as bactérias do ácido láctico produzem CLA a partir do ácido linoleico, especialmente a estirpe *Lb. plantarum* AKU 1009a. Estes autores verificaram que as BAL transformam o ácido ricinoleico (12-hydroxy-cis-9-octadecenoic acid) em CLA (uma mistura de cis-9,trans-11-18:2 e trans-9,trans-11-18:2).

2.2.7. Produção de Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos microbianos (EPS) sintetizados pelas BAL desempenham um papel importante no fabrico de produtos lácteos fermentados. Estes polímeros aumentam a viscosidade do leite, diminuem a susceptibilidade à sinérese (Cerning *et al.*, 1992), contribuem para a textura, sensação na boca, para a percepção do sabor e para a estabilidade do produto final. Além disso, já foi mencionado que os EPS, particularmente dos microrganismos lácticos, têm um potencial como aditivos e como ingredientes funcionais alimentares (Jolly *et al.*, 2002).

A produção de EPS é caracterizada por uma grande variedade em termos de quantidade, composição química, tamanho molecular, carga, tipo de cadeias laterais e rigidez das moléculas. A composição da unidade monossacarídica, os vínculos, a carga e o tamanho, determinam as propriedades intrínsecas do EPS e suas interacções com outros constituintes do leite (Jolly *et al.*, 2002). Existem três grupos importantes de EPS produzidos pelas bactérias do ácido láctico: (i) α -glucanas, compostas por resíduos de α -1,6 e α -1,3-ligados à molécula de glucose, produzidos por *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* e por *Leuconostoc*

mesenteroides subsp. *dextranicum*; (ii) fructanas, compostos de β -2,6-ligados à molécula de fructose, produzidos por *Streptococcus salivarius*; (iii) heteropolissacarídeos, produzidos por bactérias mesófilas, como o *Lc. lactis* ssp. *lactis* e *Lc. lactis* ssp. *cremoris* e por bactérias termófilas, como o *Lb. delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (Pham et al., 2000).

Existem três parâmetros importantes para a produção de EPS, nomeadamente, a concentração de carbono, azoto e a temperatura de incubação (Kimmel et al., 1998). Alguns estudos têm demonstrado uma diminuição no total de EPS produzidos quando o tempo de incubação é elevado. A diminuição do nível destes compostos durante uma fermentação prolongada pode ser devido, a uma degradação enzimática (Cerning et al., 1992) ou a mudanças dos parâmetros físicos da cultura (De Vuyst et al., 1998).

2.2.8. Actividade Antimicrobiana

As bactérias lácticas têm a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas com capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogénicos e esporulados (Herreros et al., 2005). O efeito antimicrobiano das BAL é devido, principalmente, à produção de ácido láctico e de ácidos orgânicos, fazendo com que o pH do ambiente de crescimento diminua (Caplice & Fitzgerald, 1999; Kuipers et al., 2000). O pH baixo induz a que os ácidos orgânicos tornem-se lipossolúveis e que se difundam - através da membrana celular para o citoplasma (Gottschalk, 1988).

Este grupo bacteriano também produz acetoaldeído, peróxido de hidrogénio, dióxido de carbono, diacetilo, polissacarídeos e bacteriocinas, os quais podem actuar como agentes antimicrobianos (Caplice & Fitzgerald, 1999; Rodrigues et al., 2003).

Os ácidos orgânicos, tais como o ácido láctico, ácido acético e propiónico, interferem na força protomotiva e nos mecanismos de transporte activo da membrana citoplasmática bacteriana (Davidson, 1997). A produção de peróxido de hidrogénio deve-se à carência da enzima catalase nas BAL (Forsythe, 2002). Este

composto pode causar a oxidação da membrana (Lindgren & Dobrogosz, 1990), além de activar o sistema de lactoperoxidase no leite fresco, causando a formação do hipotiocianato, um agente antimicrobiano (Forsythe, 2002).

2.2.8.1. Bacteriocinas

As bacteriocinas são proteínas antibacterianas ou proteínas complexas produzidas por várias bactérias Gram positivas ou negativas. A sua acção letal é restrita a um número limitado de espécies e algumas agem simplesmente contra algumas estirpes da mesma espécie que a produzem (Nandaneet *et al.*, s/d).

Certas culturas de lácticas sintetizam peptídeos antimicrobianos, ou bacteriocinas, com capacidade de inibir outras bactérias Gram positivas (O'Sullivan *et al.*, 2002). Apesar dos peptídeos antimicrobianos possuírem um espectro de actuação mais restrito do que os antibióticos (McAuliffe *et al.*, 2001), as bacteriocinas produzidas pelas BAL foram citadas por intervir no exterior da membrana das bactérias Gram-negativas e induzir a inactivação destas em conjunto com outros factores antimicrobianos ambientais, tais como, temperatura baixa, ácidos orgânicos e detergentes (Alakomi *et al.*, 2000).

As bacteriocinas são classificadas em três grupos principais, os Lantibióticos ou pequenos peptídeos (Classe I) estáveis ao calor, contém lantionina, com um ou dois péptidos, cujos pré-péptidos inactivos estão sujeitos a uma modificação pós-translacional extensiva; as bacteriocinas ou pequenos péptidos (Classe II) estáveis ao calor, não contém lantionina, incluem as bacteriocinas “*pediocine-like*” ou *Listeria*-activa (Classe IIa), bacteriocinas de dois-péptidos (Classe IIb) e bacteriocinas circulares (Classe IIc) e; as proteínas instáveis ao calor de grande porte (Classe III) que são líticas e muitas vezes hidrolases com estrutura de cristal entrelaçada (Klaenhammer, 1988; O'Sullivan *et al.*, 2002).

A produção de bacteriocinas no metabolismo bacteriano é maior no final da fase exponencial e no início da fase estacionária (Daba *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 2000.) e a sua redução ocorre devido à degradação proteolítica (De Vuyst & Vandamme, 1994; Thomas *et al.*, 2000).

O que mais preocupa os consumidores actualmente é o uso de aditivos químicos nos alimentos minimamente processados, funcionando como conservantes, no entanto, esta preocupação pode ser diminuída com o uso de aditivos naturais, como as bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas. A biopreservação refere o uso de microrganismos antagónicos ou os seus produtos metabólicos para inibir ou destruir os microrganismos não desejáveis nos alimentos, proporcionando assim, alimentos seguros e o aumento da vida de prateleira destes.

Existe três abordagens que são comumente utilizadas na aplicação das bacteriocinas como bioconservantes dos alimentos, nomeadamente, (1) inoculação das BAL no alimento e produção de bacteriocinas no produto, a capacidade das bactérias do ácido láctico crescerem e produzirem bacteriocinas no produto é crucial para o seu uso; (2) a adição de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas no produto como conservante e; (3) o uso de um produto previamente fermentado com bacteriocina produzida por uma estirpe como ingrediente no processamento de alimentos (Schillinger *et al.*, 1996).

A bacteriocina mais investigada e utilizada industrialmente é a nisina, e é produzida naturalmente pelo *Lc. lactis ssp. lactis*. É usada em diversos alimentos, tais como queijos, enlatados e alimentos para bebés, e é particularmente estável em alimentos ácidos (Forsythe, 2002). Todas as formas de nisina são antimicrobianas activas contra bactérias Gram positivas, tais como BAL, *Listeria spp.*, *Micrococcus sp.*, bactérias esporuladas do género *Bacillus ssp.* e *Clostridium ssp.* (Thomas *et al.*, 2000; McAuliffe *et al.*, 2001; Zendo *et al.*, 2003). Algumas culturas bacterianas, como *Clostridium botulinum* 169b (Mazzotta & Montville, 1999) e *Streptococcus bovis* JB1 são resistentes à nisina. Esta resistência é baseada na capacidade da decomposição enzimática da nisina (Breuer & Radler, 1996). A resistência à nisina pelas culturas esporuladas tem sido associada com a produção de uma enzima durante a germinação activa do C-terminal da lantionina do anel da nisina (Jarvis, 1967; Mazzotta & Montville, 1999). Breuer e Radler (1996) demonstraram que as diferentes resistências à nisina entre as culturas de *Lactobacillus casei* estão relacionados com a parede celular ligada a heteropolissacaridos, enquanto Mantovani e Russel (2001) mencionam que a resistência à nisina pela estirpe

Streptococcus bovis JB1 é devido ao facto destas células possuírem mais ácido lipoteicóico do que as células sensíveis à nisina.

As bactérias do ácido láctico também são capazes de produzir peptídeos antimicrobianos que são utilizados como forma de probiótico que actuam no trato gastrointestinal, como conservantes alimentares, promovendo a sua vida útil, bem como agentes de promoção de saúde para os seres humanos (O'Sullivan *et al.*, 2002) e animais (Torres, 2000).

As principais limitações funcionais para a aplicação de bacteriocinas nos alimentos são os seus espectros de actividade relativamente estreitos e os efeitos antibacterianos moderados. Além disso, geralmente elas são inactivas contra bactérias Gram negativas. De forma a superar estas limitações, cada vez mais pesquisadores usam o conceito da tecnologia de multi-barreiras para melhorar a segurança alimentar dos alimentos. Já foi provado que as bactérias Gram negativas tornam-se sensíveis às bacteriocinas se o conceito de barreira de permeabilidade da membrana externa for prejudicada, por exemplo, agentes quelantes, tais como o EDTA, podem ligar íões de magnésio a partir da camada de lipopolissacarídeo e perturbar o exterior da membrana destas bactérias, permitindo assim, o acesso à membrana citoplasmática (Abee *et al.*, 1995).

2.2.9. Resistência das BAL aos Antibióticos

Já há algum tempo que, tem sido dada uma maior atenção aos alimentos com potenciais veículos de genes de resistência a antibióticos (Perreten *et al.*, 1997). Acredita-se que culturas de arranque têm um potencial de servir como um reservatório de tais genes, com o risco da transferência de genes para bactérias patogénicas (Teuber *et al.*, 1999). Sendo assim, as bactérias do ácido láctico, utilizadas como probióticos ou como culturas de arranque, têm o potencial de servir como hospedeiros de genes de resistência a antibióticos, com o risco de transferência destes genes (Mathur & Singh, 2005) (Quadro 2.2), e da transferência de plasmídeos e de transposões conjugativos para outras bactérias (Teuber *et al.*, 1999). A possibilidade de transmissão dos genes de resistência de bactérias do ácido láctico tolerantes a determinados antibióticos, usadas na reconstituição da flora

intestinal, para estirpes patogénicas, ou potencialmente, deve constituir uma preocupação na selecção e segurança das estirpes com acção probiótica e quando utilizadas como cultura de arranque (Danielsen & Wind, 2003).

O mecanismo horizontal de transferência de material genético pode ocorrer em 3 vias diferentes: transdução, transformação ou conjugação. Na transdução, o ADN é transferido de uma bactéria para a outra via bacteriófago. A importância dos bacteriófagos (fagos) na disseminação da resistência aos antibióticos é determinante, contudo, é questionável, porque os fagos são espécies frequentemente muito específicas. Na transformação, o ADN é libertado de bactéria e retomado por outra, mas acredita-se que a transformação não é um mecanismo de transferência muito importante de resistência a antibióticos (Ammor *et al.*, 2007). Porém, a conjugação, por contacto directo de célula a célula, pode alcançar potencialmente a transferência horizontal de genes, como tem sido demonstrado, o mecanismo de transferência de uma gama ampla de hospedeiros (Courvalin, 1994).

Um gene de resistência bem caracterizado nas lácticas, originalmente detectado no *Enterococcus faecalis*, é o plasmídeo pAM β 1, com uma grande gama de hospedeiros, que foi transferido do *Lc. lactis* para o *Lb. reuteri*, entre lactobacilos (Tannock, 1987) e também do *Lc. lactis* para espécies de *Enterococcus* e *Lb.* (ambos *in vitro* e *in vivo*, no trato gastrointestinal do rato) (Morelli *et al.*, 1988, Gruzza *et al.*, 1993, Igimi *et al.*, 1996). Estudos recentes indicam que os factores de resistência a antibióticos podem ser transferidos a partir de espécies relacionadas com a alimentação para outras, potencialmente patogénicas, como o enterococos (Igimi *et al.*, 1996, Salyers & Shoemaker 1996, Licht *et al.*, 2003, Jacobsen *et al.*, 2007; Devirgiliis *et al.*, 2009). Outra característica interessante é que as bactérias intestinais podem também interagir com as bactérias que estão só de passagem através do cólon (bactérias comensais), permitindo que estas possam adquirir e permutar genes de resistência a antibióticos (Salyers *et al.*, 2004).

De acordo com Mathur e Singh (2005), os *Lactobacillus* têm uma elevada resistência natural a vários antibióticos, como podemos ver no Quadro 2.2. Muitas espécies de *Lactobacillus*, excluindo as espécies heterofermentativas obrigatórias,

foram encontradas como resistentes a glicopeptídeos, como a vancomicina. No entanto, esta resistência tem sido demonstrada como intrínseca (Tynkkynen *et al.*, 1998) e não pode ser comparada com a transmissão, mediada por plasmídeos de resistência encontrada nos enterococos (Leclercq *et al.*, 1992). A resistência aos aminoglicosídeos, como a neomicina, canamicina, estreptomicina e gentamicina, também têm sido observadas frequentemente em *Lactobacillus* (Danielsen & Wind 2003; Coppola *et al.*, 2005, Zhou *et al.*, 2005). Contudo, os lactobacilos apresentam susceptibilidade ao cloramfenicol, eritromicina e clindamicina, antibióticos que inibem a síntese de proteínas (Coppola *et al.*, 2005; Klare *et al.*, 2007).

Quadro 2.2. Resistência a alguns antibióticos pelas BAL (Adaptado de Mathur & Singh, 2005).

Alimentos	Espécies	Resistência
Produtos de carne crua Aves domésticas	<i>Lb. reuteli</i> G4	Cat
Carne de porco crua	<i>Lb. reuteli</i> 100-63	erm (T)
	<i>Lb. plantarum</i> caTC2R	Cm
Carne de porco crua e carne	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Leuco. mesenteroides</i>	Tetraciclina (69%)
		Cloranfenicol (3%)
		Meticilina (83%)
Produtos fermentados Queijo de leite cru macio	<i>Lc. lactis</i> estirpe K214	Str – tet – (S) cat
Queijo Grego	<i>Lb. acidophilus</i> ACA-DC-243	Penicilina
Culturas starter de igourte	<i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Neomicina, Polimixina B
Alimentos e bebidas fermentados da Nigéria	<i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> e <i>Lb. jensenii</i>	Tetraciclina (42,5%)
		Eritromicina (17,5%)
		Ampicilina (47,5%) Cloxacilina (80%) Penicilina (77,5%)
Enchidos fermentados	Espécies de <i>Lactobacillus</i>	Tetraciclina Gentamicina (79%) Penicilina G (64%) Kanamicina (79%)
Iogurtes Turcos Produtos Europeus probióticos	<i>S. thermophilus</i> <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. delbreukii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Vancomicina (65%)
		Tetraciclina (26%)
		Penicilina G (23%)
		Eritromicina (16%)
		Cloranfenicol (11%)
Outros Silagem de milho	<i>Lb. plantarum</i> 5057	tet (M)

Nome dos genes e abreviaturas: cat: gene acetilase cloramfenicol; erm: gene de resistência eritromicina; Cm: cloranfenicol; tet: gene de resistência tetraciclina; str: gene adenilase estreptomicina. Lb: *Lactobacillus*; Lc: *Lactococcus*; Leuco: *Leuconostoc*; S: *Streptococcus*.

2.2.10. Crescimento das Bactérias do Ácido Lático em Ambiente Ácido

O crescimento das BAL é caracterizado pela produção de ácido, como produto final da fermentação, que se acumula no meio extracelular, o que cria um ambiente desfavorável para muitos microrganismos. Esta característica é a base de muitos métodos usados na conservação dos alimentos através da fermentação,

contudo, estas bactérias também podem encontrar ambientes ácidos, como no estômago depois de serem ingeridas. O desenvolvimento de probióticos renovou o interesse pela sobrevivência das lácticas no tracto digestivo. A cariogenicidade das BAL orais, estreptococos e lactobacilos, está directamente relacionada com a sua acidogenicidade (capacidade de produzir ácido a pH baixos) (Quivey *et al.*, 2000).

À excepção de algumas espécies, os géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus*, apresentam um crescimento óptimo num pH entre 5 e 9. Os efeitos causados pelo stress provocado pelos ambientes ácidos na fisiologia das bactérias ainda não se conhecem ao detalhe. Mas está esclarecido que, os ácidos podem passar através da membrana celular de forma passiva e depois entrar no citoplasma, dissociar-se rapidamente em protões, originando derivados a que a membrana celular é impermeável (Presser *et al.*, 1997). A acumulação intracelular de protões baixa o pH intracelular (pHi), afectando o gradiente do pH transmembranar, contribuindo para a força motriz protónica (pmf), que é utilizada como fonte de energia em inúmeros processos de transporte transmembranar (van Maarten *et al.*, 2002). A acidificação interna também reduz a actividade das enzimas ácido-sensíveis e pode causar danos nas proteínas e no ADN. A acumulação no citoplasma de moléculas aniónicas para a dissociação de ácidos orgânicos também tem um efeito prejudicial na fisiologia da célula (Presser *et al.*, 1997).

A tolerância ao ácido (AT) nas BAL aumenta, em pelo menos três estados fisiológicos diferentes: (i) durante a fase exponencial uma resposta adaptativa referida ao L-ATR (proteínas ácido resistentes presentes nas bactérias lácticas) que pode ser induzida através da incubação em um pH ácido não letal; (ii) depois de entrar na fase estacionária, a AT aumenta como resultado da indução a uma resposta de um stress geral (Harke *et al.*, 1996) e; por último, (iii) a resposta é normalmente independente do pH externo (pHe), contudo, na estirpe *Lc. acidophilus* CRL629 o pH é necessário (Lorca & Valdez, 2001), mas não se sabe se estas respostas são independentes e se sobrepõem. O crescimento em biofilmes pode ser o terceiro estado que melhora a AT, mas esta situação foi apenas demonstrada no *Streptococcus mutans* (Li *et al.*, 2001).

A maioria das espécies lácticas testadas, à excepção de muitos *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Kim *et al.*, 1999), possui um L-ATR que melhora a sobrevivência bacteriana em meio ácido, comparadas com outras células microbianas (Kim *et al.*, 2001). A indução do L-ATR não só protege as lácticas a ambientes com mudanças a ácido como também de outros factores de stress, como o calor, choques osmóticos ou oxidativos. Este efeito protector varia entre espécies e nem sempre protege do mesmo conjunto de factores de stress (Lorca & Valdez, 2001). Muitos estudos realizados sobre a L-ATR mostraram que numerosas proteínas são induzidas durante a adaptação ao ácido, no caso das BAL (Champomier-Verges *et al.*, 2002). No entanto, apenas algumas destas proteínas foram caracterizadas (Wilkins *et al.*, 2001). A fim de desvendar a base da AT, foram realizados estudos genéticos em estirpes de *Lactococcus lactis* e *Streptococcus mutans* com a finalidade: (i) de se obterem mutantes ácido sensíveis (Gutierrez *et al.*, 1996); (ii) encontrar promotores ácido reguladores (Cvitkovitch *et al.*, 2000) e; (iii) seleccionar os mutantes ácidos resistentes (Rallu *et al.*, 2000). Análises, bioquímicas, genéticas e proteómicas, indicam que as respostas ao ambiente ácido pelas BAL são processos intricados que envolvem a síntese de uma variedade de proteínas e de vários mecanismos. Contudo ainda não se compreende completamente estas respostas, mas já é possível esclarecer alguns mecanismos de resistência que abordam os efeitos negativos do stress provocado pelo ambiente ácido, como a explosão de protões por ATP dependentes, K⁺-ATPase; a produção de compostos básicos como a desaminação da arginina, a actividade da urease, reacções de descarboxilação, o transporte electrogénico e o próprio envelope celular (van Maarten *et al.*, 2002).

2.2.11. O uso das Bactérias do Ácido Láctico em produtos Probióticos

No tracto gastrointestinal dos humanos desenvolve-se um vasto e complexo ecossistema microbiano a partir do nascimento, que forma uma flora diversa mas estável quando se atinge a idade adulta. Estes microrganismos autóctones interagem com a dieta e com o hospedeiro, contribuindo para a protecção contra os microrganismos patogénicos a nível intestinal, através da resistência, à colonização e promovendo benefícios para a saúde devido às suas actividades metabólicas

(Crittenden *et al.*, 2005). Foi demonstrado que estes também interagem com a imunidade do hospedeiro e são essenciais para a maturação e homeostase do sistema imunitário (Gibson & Robberfoid, 1995).

Os probióticos são microrganismos vivos considerados saudáveis para o organismo do hospedeiro (Figura 2.10). Segundo a definição actualmente adaptada pela WHO (World Health Organization) os probióticos são: “*Microrganismos vivos que, quando são administrados de forma adequada conferem benefícios à saúde do anfitrião*” (Badrinon & Labitte, 2010).

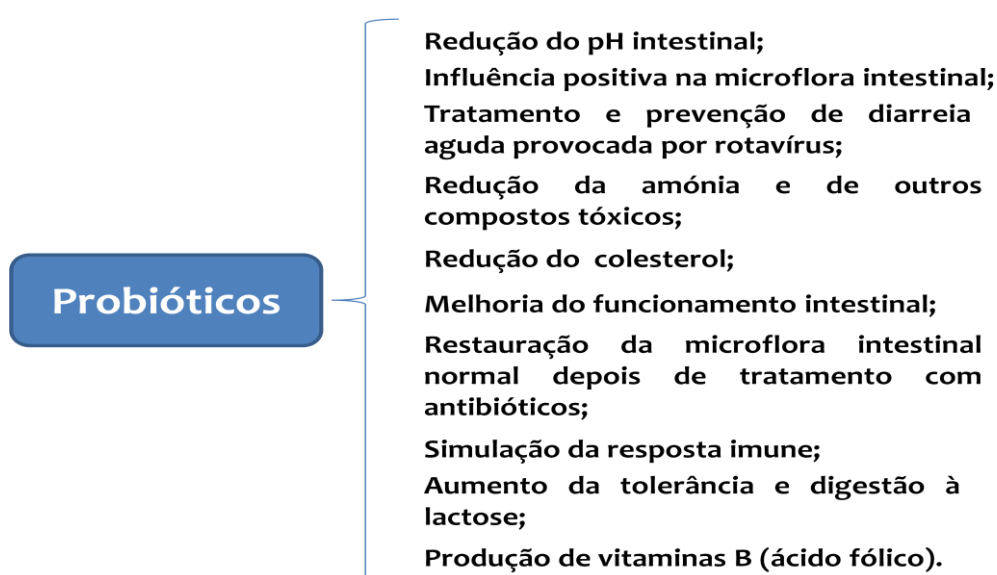


Figura 2.10. Benefícios do uso de probióticos para o hospedeiro (Adaptado de Prado *et al.*, 2008).

O mercado global deste tipo de produtos está em crescimento para satisfazer às necessidades de um consumidor cada vez mais preocupado com a sua saúde e bem-estar. Hoje os probióticos são usados numa grande variedade de produtos lácteos fermentados e não só: como leite acidófilo; iogurte; leites fermentados; kefir; queijos; bebidas lácteas; gelados; etc.

As bactérias do ácido láctico são os microrganismos mais utilizados como probióticos (Badrinon & Labitte, 2010). Dentro do género *Lactobacillus*, as estirpes mais estudadas e aceites como probióticos são *L. acidophilus* LA1, *L. acidophilus* NCFB 1748, *Lb. ramosus* GG, *Lb. casei shirota*, *Lb. gasseri* ADH e *Lb. reuteri*. Os benefícios do seu consumo são: o fortalecimento do sistema imunitário, a redução da actividade enzimática fecal, a prevenção de doenças intestinais e de diarreias

virais, tratamento e prevenção de infecções, de inflamações gastrointestinais e controlo das infecções por *Helicobacter pylori* (Dhillon *et al.*, 2007). Possuem efeitos benéficos ao nível do sistema imunitário e o controlo de agentes patogénicos por exclusão competitiva no intestino. Salienta-se também a sua actividade anticarcinogénica e o seu papel na redução do nível do colesterol (Leroy & DeVuyst, 2004). O género *Bifidobacterium*, *B. breve*, *B. longum* BB536 e o *B. lactis* Bb12, por sua vez, também contribui para o bom funcionamento do intestino, reduzindo o problema de irritação deste e podem ser utilizadas no tratamento de alergias, melhoram a diarreia provocada por agentes do rotavírus e diminuem a incidência da diarreia dos viajantes (Ouwehand *et al.*, 2002.).

A escolha de um microrganismo, para o seu uso como um potencial probiótico, é feita através da observação de diferentes características, mencionadas no Quadro 2.3.

Quadro 2.3. Algumas propriedades das bactérias probióticas (Adaptado de Ouwehand *et al.*, 2002).

Propriedades	Benefícios
Resistência às enzimas pancreáticas, ácido e biliar	Sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal
Adesão à mucosa intestinal	Modulação imune Exclusão dos patógenos Melhora a cicatrização dos danos na mucosa Prolonga a colonização intestinal (?)
Origem Humana	Interações específicas entre espécies e o anfitrião
Efeitos sobre a saúde documentados	Os efeitos propostos são verdadeiros
Segurança	Nenhum risco para o consumidor
Boas propriedades tecnológicas	Estabilidade Produção em grande escala Tolerância ao oxigénio

Diversas espécies de *Lactobacillus* têm revelado resistência ao stress causado *in vivo* e algumas estirpes apresentam boas propriedades tecnológicas, explicando assim o seu uso como probióticos. As *Bifidobacterium* são também normalmente utilizadas, embora menos que os lactobacilos. Estas são sensíveis à presença do oxigénio e apresentam mais requerimentos para o seu crescimento. Outras espécies probióticas, à excepção das propionibactérias e enterococos, não são normalmente usadas nos produtos fermentados, mas sim em suplementos dietéticos, sob a forma de cápsulas, comprimidos ou saquetas (Ouwehand *et al.*, 2002).

A dose necessária para obter efeitos benéficos para a saúde variam com: o tipo e a quantidade de células viáveis até ao final da vida útil do produto; a dose ingerida; as características do alimento onde foram inoculados os microrganismos; e com as características do hospedeiro (WGO, 2008). A concentração mínima de BAL no intestino para promover um efeito protector é da ordem de 10^9 UFC, sendo fundamental uma ingestão regular destes agentes para se conseguir este teor (Tannock *et al.*, 2000).

O uso dos probióticos na alimentação animal também tem sido um factor importante nos dias que decorrem, uma vez que estes, tal como nos humanos, proporcionam benefícios positivos (Corcionivoschi *et al.*, 2010). As vantagens no uso de probióticos para prevenir e combater transtornos digestivos nos animais são: promover o balanço e a multiplicação da microflora do trato gastrointestinal (Collado *et al.*, 2007); a estimulação da resposta do hospedeiro, como resposta específica ao estímulo proliferativo das células periféricas mononucleadas do sangue (Strompfova *et al.*, 2007); a inibição das bactérias potencialmente patogénicas, produzindo uma grande variedade de substâncias inibidoras quer para bactérias Gram positivas quer Gram negativas (Schierack *et al.*, 2009). Por outro lado, o uso de probióticos na alimentação dos animais tem influência na produção, por melhorar a taxa de crescimento, aumentado a produção de carne, leite e ovos (Musa *et al.*, 2009). Desta forma, o seu uso na pecuária é cada vez mais desejável, uma vez que pode substituir o uso de determinados antibióticos ou outros produtos farmacêuticos para o tratamento de animais, o que vai em conta aos pedidos dos consumidores ao nível da qualidade dos produtos e às exigências legais.

3. Materiais e Métodos

3.1 Amostra

3.1.2. Caracterização e Colheita das Amostras

Foram colhidas, no ano de 2010, amostras de soro fermento resultante do fabrico artesanal do Queijo São Jorge DOP. A amostragem foi efectuada em diferentes cubas de fabrico, nas cooperativas da Beira e Lourais, da Ilha de São Jorge, Açores. As amostras foram mantidas refrigeradas durante o transporte, por via aérea, até ao momento de recepção no laboratório, na Ilha Terceira, o que ocorreu nas 24 horas seguintes. No laboratório, as amostras foram subdivididas em alíquotas, em tubos de ensaio previamente esterilizados, armazenadas e mantidas sob refrigeração até posterior análise. Os duplicados destas sub-amostras foram também ultra-congeladas, à temperatura de -80°C.

3.2. Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados para isolamento e replicação das BAL foram: o Plant Count Agar (PCA), ao qual se adicionaram aditivos (Corroler *et al.*, 1998; Stoffels *et al.*, 1992), de forma a torná-lo selectivo e mais rico a nível nutricional, o bromocresol (20 mg/l), como indicador de pH, o ácido nalidixico (40 mg/l), como inibidor do crescimento de bactérias Gram negativas, o Skim Milk Powder (10% p/v), para enriquecer o meio e sorbato de potássio (0,05% p/v), enquanto inibidor do crescimento de bolores e leveduras; Man Rogosa and Sharp (MRS) Agar; M17 Agar, suplementado com lactose a 10% (p/v), conforme preceituado por Gala *et al.*, (2008) e Mayex Sandine Elliker Agar (MSE) (Hoorde *et al.*, 2008).

3.3. Condições de incubação

As culturas, inoculadas tanto em meio líquido como em meio sólido, foram sempre incubadas em condições de anaerobiose, a 30, 37 e 42°C, durante 48 horas. Para o efeito utilizaram-se jarras de anaerobiose com Kits de anaerobiose

(Anaerocult A, Merck), utilizando-se sempre um indicador de anaerobiose (Anaerotest, Merck).

3.4. Isolamento das bactérias do ácido láctico

Foram realizadas diluições decimais sucessivas seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) do soro fermento, sendo estas inoculadas por espalhamento à superfície (0,1 ml) nos diferentes meios de cultura utilizados, de forma a se obterem colónias completamente individualizadas. Após a incubação, durante 48 horas, a 3 diferentes temperaturas (30, 37 e 42°C), isolaram-se de cada placa 4 a 5 colónias completamente individualizadas e com diferentes características, com a finalidade de tentar recuperar o maior número de espécies possíveis. O grau de pureza dos isolados foi avaliado por observação do crescimento das colónias e por observação microscópica, após sucessivas repicagens.

À medida que os isolados foram considerados puros, foram mantidos a 4°C, em rampas nos respectivos meios de crescimento sólidos. No final, todos os isolados foram inoculados em caldo MRS, incubados durante 48 horas à temperatura do respectivo isolamento, centrifugados a 4.000 rpm durante 15 minutos, ressuspensos em água peptonada com glicerol a 30% (v/v) e conservados a -80°C em tubos do tipo Eppendorf, para futuros ensaios.

3.5. Caracterização e identificação dos diferentes isolados

A classificação fenotípica dos isolados considerados puros foi feita de acordo com as suas características fisiológicas e bioquímicas. Assumindo que, entre outras características, as bactérias lácticas são microrganismos Gram positivos, catalase negativos, não esporulados, os diferentes isolados foram seleccionados em primeira mão em função da sua reacção de Gram e de catalase, além disso, realizaram-se ainda os seguintes testes: microscopia de contraste de fase para avaliar a forma, teste da oxidase, fermentação dos diferentes carboidratos, capacidade de crescimento a diferentes temperaturas, a diferentes concentrações de NaCl e de pH. Verificou-se a produção de CO₂ a partir da glucose, a hidrólise da arginina e a

produção de diacetilo. Também se analisou a capacidade de acidificação de cada um dos isolados, a sua actividade proteolítica, o perfil enzimático, a actividade antimicrobiana e, por fim, a resistência das lácticas isoladas a diferentes antibióticos.

3.5.1. Crescimento dos isolados para os diferentes testes

Os isolados foram cultivados em caldo MRS (OXOID), a 1% (v/v), durante 24 horas, a 37°C e reinoculados sobre as mesmas condições. No entanto, para os testes fermentação dos hidratos de carbono e perfil enzimático os isolados foram reinoculados para MRS Agar sob as mesmas condições de tempo e temperatura.

3.5.2. Fermentação dos hidratos de carbono

Para a realização dos diferentes testes de fermentação dos hidratos de carbono, foram utilizadas galerias API 50 CH e API 20 STREP (bioMérieux, France) (Thapa *et al.*, 2006). Para a inoculação das galerias seguiram-se as recomendações do respectivo fabricante. Em que se seleccionou uma colónia individual e procedeu-se seguindo as indicações da bioMérieux para a utilização das respectivas galerias. Na leitura dos resultados foi utilizado o software, ApiWeb.

3.5.3. Curvas de Crescimento

Por forma, a analisar o crescimento dos isolados puros efectuou-se o estudo das respectivas curvas de crescimento. De maneira a que os isolados iniciassem o seu crescimento com a mesma concentração foram medidas as respectivas densidades ópticas a 600 nm. Durante o teste, as leituras das respectivas DO_{600nm} foram feitas de hora a hora, bem como também a leitura do pH, com a finalidade de se saber a sua variação ao longo do tempo.

3.5.4. Capacidade de crescimento a diferentes pH

Após o crescimento retirou-se 0,100 ml de cada cultura e ressuspendeu-se para tubos com 10 ml de caldo MRS com o pH modificado, a 3,5, 4,5, e 8,5 respectivamente (Salama *et al.*, 1994; Thapa *et al.*, 2006). Incubou-se a uma temperatura de 37°C durante 7 dias, fazendo-se uma leitura todos os dias (Drosinos *et al.*, 2008). Consideraram-se como controle os respectivos isolados incubados em caldo MRS, com um pH=5,8 a 37°C, e com o tempo de crescimento óptimo (o tempo em que cada isolado entrou em fase estacionária), comparando-se visualmente, o grau de turvação entre os tubos - controle e teste. O ensaio foi realizado em duplicado.

3.5.5. Capacidade de crescimento a diferentes concentrações de NaCl

Após o crescimento foi retirado 0,100 ml de cada cultura e ressuspendida para tubos com 10 ml de caldo MRS, com uma concentração de NaCl modificada, a 4%, 8%, 12% e 16% respectivamente (Leisner *et al.*, 1999; Thapa *et al.*, 2006). Incubou-se a uma temperatura de 37°C durante 7 dias, fazendo-se uma leitura todos os dias (Drosinos *et al.*, 2008). Considerou-se como controle os respectivos isolados crescidos em caldo MRS sem a adição de NaCl, com um pH=5,8 a 37°C, e como tempo de crescimento óptimo, comparando-se visualmente, o grau de turvação entre os tubos - controle e teste. O teste foi realizado em duplicado.

3.5.6. Capacidade de crescimento a diferentes temperaturas

Os diferentes isolados foram testados quanto à sua capacidade de crescerem a 15°C e a 45°C, em caldo MRS, fazendo-se as leituras às 24 e 48 horas (Drosinos *et al.*, 2008; Drosinos *et al.*, 2006; Thapa *et al.*, 2006; Franciosi *et al.*, 2009). Foi retirado 0,100 ml de cada cultura crescida e ressuspendeu-se para tubos com 10 ml caldo MRS, que foram a incubar às temperaturas teste. Consideraram-se como controle os respectivos isolados crescidos em caldo MRS, com um pH=5,8 a 37°C, com um tempo de crescimento óptimo, comparando-se visualmente, o grau de turvação entre os tubos, controle e teste. O teste foi realizado em duplicado. Por outro lado,

as temperaturas de isolamento, nomeadamente, a 30, 37 e 42°C, também nos serviram de indicador da capacidade de crescimento das culturas.

3.5.7. Produção de CO₂ a partir da glucose

Colocaram-se 10 ml de caldo MRS em tubos de ensaio, contendo tubos de Durham invertidos que foram posteriormente autoclavados durante 15 minutos a 120°C. Após o crescimento, os isolados foram ressuspensos a 1% (v/v) nos tubos com o preparado, incubados a 37°C durante 48 horas. Consideraram-se positivos os tubos de Durham com gás no seu interior e negativos os que não possuíam gás (Drosinos *et al.*, 2006). O teste foi realizado em duplicado.

3.5.8. Hidrólise da Arginina

O meio de cultura utilizado para verificar a hidrólise da arginina foi preparado em laboratório. Consistiu em, 0,5% de extracto de Levedura, 0,5% de triptona, 0,2% de K₂HPO₄, 0,05% de glucose e 0,3% de d-arginina mono-hidroclorídica, com um pH final de 7. A arginina foi adicionada directamente ao preparado, sendo este depois esterilizado em autoclave. O mesmo meio, sem arginina, foi utilizado como controlo. Da cultura activa, foram pipetados 0,100 ml para os tubos com o meio contendo a arginina e foram incubar a 37°C durante 48 horas. Para o teste adicionou-se uma gota do reagente de Nessler's solução A e da solução B. O teste foi considerado positivo sempre que se verificou o desenvolvimento de cor amarelo (Niven *et al.*, 1941). Este teste foi também realizado em duplicado.

3.5.9. Capacidade de acidificação

Após o crescimento dos isolados puros, as BAL foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 15 minutos, o *pelet* foi ressuspensado em água peptonada e inoculado (1% (p/v)) em 10 ml de leite gordo UHT e incubados a 37°C. As leituras do pH, foram efectuadas de 2 em 2 horas nas primeiras 8 horas de crescimento, depois às 24 e 48 horas (Franciosi *et al.*, 2009).

3.5.10. Actividade Proteolítica

Após o crescimento, foram centrifugados a 4.000 rpm durante 15 minutos e o *pelet* foi ressuspendido em água peptonada. Em seguida, procedeu-se ao isolamento em meio de cultura composto por 10% (p/v) de Skim Milk e 2% (p/v) de agar e incubou-se a 37°C durante 4 dias. A actividade proteolítica foi indicada por uma zona mais transparente em torno das colónias (Franciosi *et al.*, 2009). O teste foi realizado em duplicado.

3.5.11. Produção de Diacetilo

Após o crescimento, os isolados foram centrifugados a 4.000 rpm durante 15 minutos. O *pelet* foi ressuspendido em água peptonada, inoculado (1% (p/v)) em 10 ml de leite gordo UHT e incubados a 30°C durante 24 horas. Após isso, a 1 ml de cultura foi adicionado 0,5 ml da solução α -naphthol (1% (p/v)) e KOH (16% (p/v)) procedendo-se à incubação a 30°C durante 10 minutos. A produção de diacetilo foi indicada pela formação de um anel vermelho no topo dos tubos (King, 1948). Conforme a intensidade da cor do anel, os resultados foram classificados em fraco, médio e forte (Figura 3.1). O teste foi realizado em duplicado.



Figura 3.1. Classificação das diferentes tonalidades do vermelho no teste de verificação da produção de diacetilo. Da esquerda para a direita: negativo, positivo fraco, positivo médio e positivo forte.

3.5.12. Perfil Enzimático

Para este estudo utilizou-se o método de Arora *et al.*, (1990), através de galerias API-Zym (BioMérieux®, França), que contém 19 enzimas, nomeadamente: fosfatase alcalina, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucina arilamidase, valine arilamidase, Cistina arilamidase, tripsina, α -quimiotripsina, fosfatase ácida, Naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α - galactosidase, β - galactosidase, α -glucosidase, β - glucosidase, N-aetil- β -glucosaminidase, α -manosidase e α -fucosidase. Para este testes, seleccionou-se uma colónia individual após o crescimento descrito no ponto 3.5.1 e prosedeu-se às indicações do fabricante das galerias.

3.5.13. Actividade Antimicrobiana

A actividade antimicrobiana das diferentes bactérias lácticas foi testada em relação a dois microrganismos patogénicos: *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. As culturas destes agentes patogénicos foram inoculadas a 1% (v/v) em Brain Heart Infusion (BHI, Merck) e incubadas, durante 24 horas a 37°C, reinoculadas no mesmo meio e incubadas durante 17 horas a 37° C. Para este teste é importante que a concentração de células nos tapetes microbianos na superfície do meio sólido seja sensivelmente uniforme para as diferentes culturas testadas, uma vez que a razão concentração de células/concentração de composto inibitório afecta significativamente os valores de inibição obtidos. Assim, as culturas foram centrifugadas a 4.0000 rpm durante 15 minutos, lavadas em tampão fosfato de potássio (KPi) 50 mM, a pH 7, e ressuspendidas no mesmo tampão. O volume de tampão utilizado foi calculado, com base nos valores DO_{600nm} das respectivas culturas, por forma, a se obter sempre a mesma concentração final de células (DO_{600nm} de 0,42 m^{-1}).

Como o interesse deste estudo foi verificar e caracterizar a natureza da actividade antimicrobiana realizou-se diferentes testes, em que, da cultura mãe se preparam 3 tubos de ensaio teste:

- (i) No primeiro tubo de ensaio a cultura mãe;

(ii) No segundo tubo, apenas a cultura. Esta foi obtida centrifugando, durante 15 minutos, a 4000 rpm, a partir da cultura mãe, separando-se posteriormente o *pelet* do sobrenadante, adicionando-se meio fresco (caldo MRS);

(iii) No terceiro o sobrenadante. Este foi separado do mesmo modo descrito no ponto anterior e depois filtrado, com microfiltros de 0,22 μm .

Após, se ter verificado que existia actividade antimicrobiana no sobrenadante procedeu-se à sua caracterização. Efectuando-se o procedimento ao sobrenadante da mesma forma anteriormente descrita, sucedendo-se aos seguintes tratamentos:

(iv) Com o pH ajustado para 6,5, com NaOH a 1N;

(v) Com tratamento térmico, ao qual os tubos foram sujeitos a uma temperatura de 120°C durante 15 minutos.

A actividade anti-microbiana foi testada pelo método de difusão em agar (Djaljit & Kaur, 1999). Todos os testes foram realizados em triplicado.

3.5.14. Resistência a antibióticos

A resistência aos antibióticos foi avaliada segundo o Método de Kirby Bauer (Ferreira & Sousa, 1998), testando-se a sensibilidade dos isolados das bactérias do ácido láctico relativamente a 11 antibióticos, recorrendo-se a discos (Oxoid) contendo antibiótico cuja concentração foi determinada segundo as normas CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute). Os antibióticos utilizados foram: clindamicina (2 μg), cloranfenicol (30 μg), neomicina (30 μg), gentamicina (10 μg), ampicilina (10 μg), penicilina (10 UI), eritromicina (15 μg), lincomicina (15 μg), rifampicina (5 μg), sulfametoxazole/trimetropina (1,25/23,75 μg) e norfloxacina (10 μg).

Utilizou-se o meio de cultura Muller Hinton, distribuído em placas de Petri com uma espessura de aproximadamente 4 mm. Após o crescimento, foram centrifugadas (a 4.000 rpm durante 15 minutos), suspendeu-se a cultura em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH=7) com uma densidade final de 0,5 unidades

MacFarland (avaliada com recurso ao Densitómetro Densimat, BioMérieux®, França).

A decisão quanto à resistência ou sensibilidade foi feita recorrendo-se às tabelas de interpretação do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), versões M100-S20 de 2010 (tabela geral, recomendado pela OXOID) e M100-S21 de 2011 (Tabela dos *Enterococcus ssp.*) e, do CASFM (Comité de L'antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie) recomendações de 2010 (tabela dos *Enterococcus ssp.*). Porém, no caso das BAL, não é comum determinar-se a susceptibilidade aos antibióticos, sendo que não foi possível encontrar-se um valor de referência específico, visto que as tabelas que existentes terem sido elaboradas para agentes patogénicos. Por essa razão utilizámos os valores de referência dos grupos geneticamente mais próximos, como os *Enterococcus ssp.* (Citron, 2010; Belletti et al., 2009) e quando não existiu uma referência a um determinado antibiótico para este grupo utilizou-se a tabela geral, construindo-se assim, uma tabela de referência para os antibióticos utilizados (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Tabela da referência para as leituras dos antibiogramas, segundo o NCCLS e o CASFM.

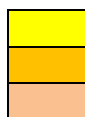
Código	Nome Completo	Família/Grupo	Quantidade por disco	Diâmetros críticos (mm)		
P	Penicilina	Penicilinas	10 U	≥15	-	≤14
CN	Gentamicina	Aminoglicosídeos	10 µg	≥15	13-14	≤12
DA	Clindamicina	Lincosamidas	2 µg	≥17	15-16	≤14
C	Cloranfenicol	Fenicois	30 µg	≥18	13-17	≤12
E	Eritromicina	Macrólidos	15 µg	≥23	14-22	≤13
RD	Rifampicina	Ansamícinas	5 µg	≥20	17-19	≤16
SXT	Sulfametoxazol/Trimetoprim	Sulfamidas	1.25/23.75 µg	≥16		<10
AMP	Ampicilina	Penicilinas	10 µg	≥17	-	≤16
MY	Lincomicina	Lincosamidas	15 µg	≥21		<17
NOR	Norfloxacina	Fluoroquinolonas	10 µg	≥17	13-16	≤12
N	Neomicina	Aminoglicosídeos	30 µg	≤16	14-15	≤13

Legenda.

Referências do CASFM

Referências do CLSI, versão M100-S21

Referências do CLSI, versão M100-S20



Ao longo de todos os trabalhos, em todos os procedimentos, foram mantidas rigorosas condições de assépsia e utilizadas as boas práticas, geralmente recomendadas em microbiologia (Harrigan, 1998).

4. Resultados

4.1 Isolamento de diferentes colónias

O isolamento de culturas puras de bactérias que vivem em natureza normalmente em simbiose é muito difícil, dada a dependência das espécies umas das outras para o seu crescimento, nomeadamente, de nutrientes que são libertados no meio como resultado do seu metabolismo (Biscaia *et al.*, 2004).

Inicialmente obteve-se 127 isolados dos quais após várias repicagens 83 foram considerados puros (ver no Quadro 4.1). Dos 44 isolados considerados impuros, das amostras A, B, C, F, G e H, encontram-se entre a 5ª e a 15ª repicagem (Anexo I, Quadro 1).

Quadro 4.1. Número de isolados por amostra de soro fermento.

Amostra	Nº de Isolados	Nº de isolados puros	Nº de isolados Impuros
A	35	19	16
B	18	9	9
C	52	40	12
E	3	3	-
F	5	2	3
G	5	3	2
H	9	7	2
Total	127	83	44

O meio de cultura de onde se obteve uma maior percentagem de isolados foi o M17 Agar com lactose adicionada a 10% (p/v) (68,5%), dos quais 20,47% foram obtidos a 42°C; 25,2% a 37°C; e 22,83% a 30°C (Quadro 4.2).

Quadro 4.2. Isolados obtidos nos diferentes meios de cultura, a diferentes temperaturas.

Meios de Cultura	Isolados	Temperatura	Total
MRS Agar	5 (3,94%)	42°C	37 (29,13%)
M17 Agar (com Lactose 10% (p/v))	26 (20,47%)		
MSE Agar	6 (4,72%)		
MRS Agar	14 (11,02%)	37°C	49 (38,58%)
M17 Agar (com Lactose 10% (p/v))	32 (25,20%)		
MSE Agar	3 (2,36%)		
MRS Agar	8 (6,3%)	30°C	41 (32,28%)
M17 Agar (com Lactose 10% (p/v))	29 (22,83%)		
MSE Agar	4 (3,15%)		

4.2. Caracterização Fenotípica e Bioquímica dos Isolados

4.2.1 Caracterização Morfológica das Colónias

A caracterização das colónias foi feita com base nas características morfológicas descritas na Figura 1 do Anexo II. Nas primeiras repicagens foram isoladas colónias com morfologias muito diferentes, tanto em termos de forma, como de recorte, relevo cor e tamanho. Obviamente que o tipo de colónias encontradas foi condicionado pelo meio de cultura em que estas foram isoladas. No PCA modificado, as colónias apresentavam dimensões entre os 6 e os 2 mm, com cores beges e esbranquiçadas, com formas regulares, margens inteiras e irregulares e com um corte circular. Após, as sucessivas repicagens para os diferentes meios de cultura, MRS, M17 e MSE agar, estas mantiveram a sua forma, cor e corte, alteraram a margem para inteira, apresentaram uma elevação convexa e dimensões entre os 4 e os 2 mm. As colónias maiores foram encontradas nos meios MRS e M17 Agar e as mais pequenas no meio MSE Agar (Figura4.1).

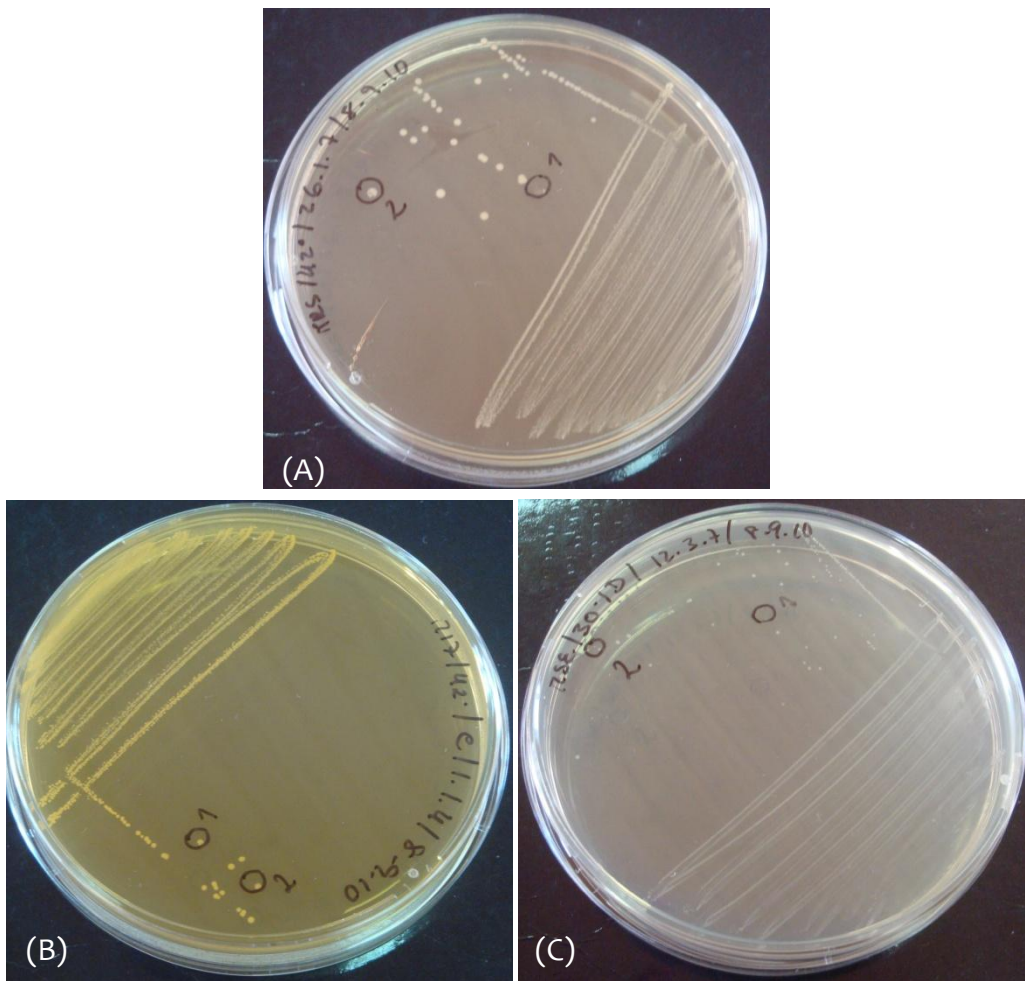


Figura 4.1. Morfologia das diferentes colónias em meio MRS Agar (A), M17 Agar (B) e MSE Agar (C).

4.2.2. Morfologia das células

Dos 83 isolados puros, 53,01% foram bacilos, 21,69% cocos e 25,30% cocobacilos (Figura 4.2).

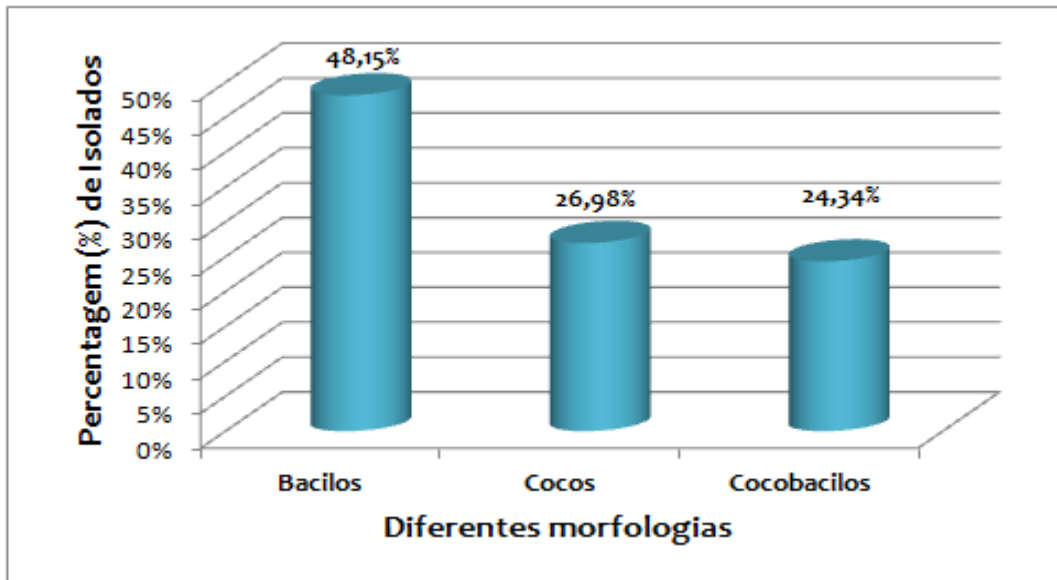


Figura 4.2. Distribuição percentual dos 83 isolados considerados puros, em função da sua morfologia.

No grupo dos bacilos houve uma maior percentagem de bacilos curtos e grossos, normalmente aos pares ou em rosário, e menor de bacilos longos e estreitos. Também se observaram bacilos pequenos em forma de “pevide”. No grupo dos cocobacilos incluíram-se não só os bacilos com um aspecto mais arredondado como também os cocos achatados em forma de rosário, aos pares (Figura 4.3).

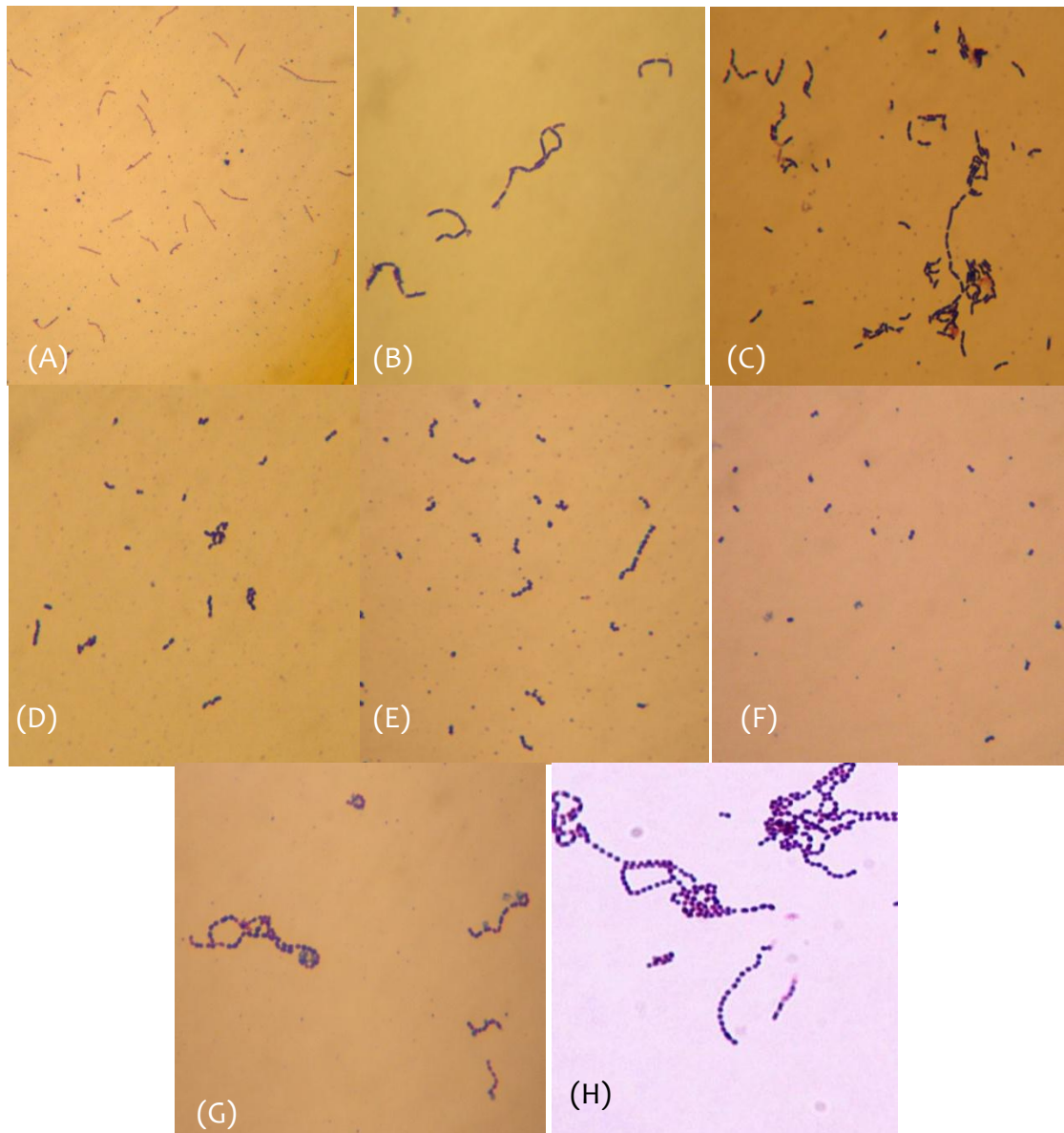


Figura 4.3. (A) Bacilos longos e estreitos, (B) Bacilos curtos e grossos, (C) Bacilos ainda mais curtos, e grossos, (D) Bacilos em forma de “pevide” e grossos, (E) Cocobacilos aos pares, (F) Cocobacilos em rosário e (H) Cocos em rosário.

4.2.3 Teste da Catalase e Oxidase

Tal como era de esperar os 83 isolados revelaram-se negativos aos testes da catalase e da oxidase.

4.2.4. Fermentação dos Carbohidratos

Depois de se ter verificado que os isolados eram todos Gram positivos, catalase e oxidase negativos, passou-se à sua identificação através de galerias miniaturizadas API 50 CHL e API 20 STREP (Thapa et al., 2006).

Dos 83 isolados puros, 15 eram microrganismos não desejados, como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Aerococcus viridans* e *Aerococcus urinae*, que foram descartados. Dos 68 isolados pertencentes ao grupo BAL, 40 eram *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, dos quais 39 pertencentes ao biótipo 1 e o restante ao biótipo 3; 18 eram *Lactococcus lactis ssp. lactis*, dos quais 11 pertencem ao biótipo 1; 2 *Lactobacillus plantarum*; 1 *Lactobacillus rhamnosus*; 1 *Lactobacillus curvatus ssp. curvatus*; 1 *Streptococcus s thermophilus*; 2 *Pediococcus pentosaceus*; e 3 *Enterococcus durans* (Quadro 4.3.) (em Anexo III encontra-se os resultados das galerias API por espécie).

Quadro 4.3. Resultados da identificação dos 83 isolados através de galerias miniaturizadas API 50 CHL e API 20 STREP.

Espécie	Nº de Isolados
<i>Lb. curvatus ssp. curvatus</i>	1
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	39
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 3</i>	1
<i>Lb. plantarum</i>	2
<i>Lb. rhamnosus</i>	1
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	7
<i>Lc. lactis ssp. lactis1</i>	11
<i>Enterococcus durans</i>	3
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2
<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	7
<i>Streptococcus uberis</i>	3
<i>Aerococcus viridans</i>	4
<i>Aerococcus urinae</i>	1

A espécie com maior número de isolados foi o *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* (40), dos quais se seleccionaram 13 para realizar os testes de

caracterização bioquímica. O critério de selecção foi baseado na percentagem de identificação das galerias API, sendo escolhidas apenas as que apresentaram uma probabilidade de identificação superior a 96%. Uma vez que esta espécie não deve crescer a temperaturas superiores a 45°C, todos com crescimento positivo foram conservados para futuros testes de identificação molecular (Anexo IV, Quadro 1).

4.2.5. Curvas de crescimento

Foram observadas as curvas de crescimento das BAL, em caldo MRS, com pH=5,8, a 37°C (Anexo V). À medida que se mediu o crescimento também se aferiu a evolução do pH. Com os resultados obtidos calculou-se as taxas de crescimento (h^{-1}) de cada isolado e a velocidade de acidificação ($\Delta pH/h$).

Dentro do grupo dos lactobacilos (Quadro 4.4) a espécie que apresentou uma taxa de crescimento maior foi o *Lb. rhamnosus* ($0,310 h^{-1}$). Pelo contrário foi o isolado 1 de *Lb. paracasei ssp. paracasei* que revelou uma taxa de crescimento menor ($0,102 h^{-1}$). Quanto à velocidade de acidificação, também houve variação ao longo do grupo de isolados; o isolado 10 do *Lb. plantarum* revelou uma maior velocidade de acidificação ($0,096 \Delta pH/h$) e, no outro extremo, o isolado 13 do *Lb. paracasei ssp. paracasei* ($0,045 \Delta pH/h$). Foram os dois isolados do *Lb. plantarum* e o isolado 13 *Lb. paracasei ssp. paracasei* que desenvolveram o pH mais baixo e, o isolado 1 *Lb. paracasei ssp. paracasei* que obteve o pH mais elevado (Quadro 4.4)

O isolado *Lb. curvatus ssp. curvatus* obteve uma taxa de crescimento de $0,169 h^{-1}$, alcançando a fase estacionária às 26 horas de crescimento (Anexo III, Figura 2). A velocidade de acidificação foi de $0,094 \Delta pH/h$ e o pH final atingido foi, aproximadamente, 3,8 (Quadro 4.4).

No grupo de isolados da espécie *Lb. paracasei ssp. paracasei* houve alguma variação no crescimento (Anexo V, Figura 3), o que se reflectiu numa variação na taxa de crescimento e na velocidade de acidificação. O isolado com maior taxa de crescimento foi o 6 ($0,279 h^{-1}$) e, o que teve a menor foi o 1 ($0,102 h^{-1}$). Os isolados 3, 5, 18 e 38 apresentaram taxas de crescimento semelhantes, assim como, os 13, 24, 26 e 28. A velocidade de acidificação também variou entre eles, o isolado 26 apresentou a velocidade mais elevada ($0,096 \Delta pH/h$) e menor o 13 ($0,045 \Delta pH/h$). No

entanto, foi o 13 que atingiu um pH mais baixo (pH=3,703) e o mais alto foi o 1 (pH=4,565) (Quadro 4.4).

Quadro 4.4. Taxas de crescimento, velocidade de acidificação e pH final dos vários isolados *Lactobacillus*.

Espécie	Código dos Isolados	Taxa Crescimento (h ⁻¹)	Velocidade de acidificação (ΔpH/h)	pH final
<i>Lb. curvatus ssp. curvatus</i>	(8)	0,169	0,094	3,849
<i>Lb. plantarum</i>	(7)	0,273	0,094	3,741
<i>Lb. plantarum</i>	(10)	0,2516	0,096	3,736
<i>Lb. rhamnosus</i>	(14)	0,310	0,060	4,240
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(1)	0,102	0,052	4,565
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(3)	0,157	0,089	3,860
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(4)	0,126	0,081	4,007
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(5)	0,148	0,052	4,487
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 3</i>	(6)	0,279	0,063	4,271
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(12)	0,223	0,054	4,513
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(13)	0,178	0,045	3,703
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(18)	0,159	0,092	4,08
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(24)	0,178	0,070	4,345
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(26)	0,177	0,096	3,98
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(28)	0,182	0,061	4,548
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(34)	0,203	0,061	4,522
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(38)	0,161	0,095	3,909

No grupo de isolados do *Lc. lactis ssp. lactis* houve alguma variação no crescimento dos microrganismos. O tempo em que cada isolado atingiu a fase estacionária foi diferente, variando entre as 11 e as 24 horas (Anexo V, Figura 6), reflectindo também uma taxa de crescimento variável. O isolado que atingiu uma taxa de crescimento maior foi o 11 (0,374 h⁻¹) e o que atingiu uma menor foi o 35 (0,175 h⁻¹). O pH final mais baixo atingido neste grupo foi de 4,054 (isolado 22) e o mais alto foi atingido pelo isolado 35 (pH=4,542). A velocidade de acidificação foi semelhante no grupo, variando entre os 0,060 ΔpH/h e 0,078 ΔpH/h, ver Quadro 4.5.

Quadro 4.5. Taxas de crescimento, velocidade de acidificação e pH final dos isolados *Lc. lactis ssp. lactis*.

Espécie	Código dos Isolados	Taxa Crescimento (h ⁻¹)	Velocidade de acidificação (ΔpH/h)	pH final
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(2)	0,292	0,062	4,289
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(9)	0,315	0,071	4,190
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(11)	0,374	0,068	4,177
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(16)	0,268	0,065	4,278
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(17)	0,313	0,064	4,274
<i>Lc. lactis ssp lactis</i>	(19)	0,302	0,071	4,245
<i>Lc. lactis ssp lactis</i>	(20)	0,277	0,064	4,288
<i>Lc. lactis ssp lactis</i>	(21)	0,249	0,063	4,245
<i>Lc. lactis ssp lactis</i>	(22)	0,228	0,078	4,054
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(25)	0,309	0,067	4,234
<i>Lc. lactis ssp lactis</i>	(27)	0,236	0,060	4,364
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(29)	0,301	0,062	4,327
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(31)	0,236	0,060	4,362
<i>Lc. lactis ssp lactis</i>	(32)	0,295	0,067	4,289
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(33)	0,305	0,067	4,296
<i>Lc. lactis ssp lactis</i>	(35)	0,175	0,078	4,542
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(36)	0,280	0,068	4,300
<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i>	(37)	0,269	0,065	4,301

O crescimento dos isolados da espécie *Enterococcus durans* foi semelhante. Os microrganismos 39 e 41 atingiram a fase estacionária entre as 13 e 15 horas (Anexo V, Figura 1). No entanto, o isolado que obteve uma maior taxa de crescimento foi o 39 (0,344 h⁻¹) e o que obteve uma menor foi o 40 (0,244 h⁻¹). Quanto à velocidade de acidificação, o isolado que obteve um resultado maior foi o 40 (0,062 ΔpH/h) e, o que apresentou uma menor foi o 39 (0,051 ΔpH/h). Foi também o 39 que obteve um pH final mais baixo (pH=4,49), seguindo-se o 41 (pH=4,501) e por fim o 40 (pH=4,566), ver Quadro 4.6.

Quadro 4.6. Taxas de crescimento, velocidade de acidificação e pH final dos isolados *Enterococcus durans*.

Espécie	Código dos Isolados	Taxa Crescimento (h ⁻¹)	Velocidade de acidificação (ΔpH/h)	pH final
<i>Enterococcus durans</i>	(39)	0,344	0,051	4,490
<i>Enterococcus durans</i>	(40)	0,244	0,062	4,566
<i>Enterococcus durans</i>	(41)	0,309	0,057	4,501

O crescimento dos dois isolados da espécie *Pediococcus pentosaceus* também foi semelhante. Ambos levaram aproximadamente 24 horas a atingir a fase estacionária (Anexo V, Figura 7). O isolado 23 atingiu um pH final mais baixo (pH=4,345) sendo o que apresentou uma velocidade de acidificação menor (Quadro 4.7).

Quadro 4.7. Taxas de crescimento, velocidade de acidificação e pH final dos isolados *Pediococcus pentosaceus*.

Espécie	Código dos Isolados	Taxa Crescimento (h ⁻¹)	Velocidade de acidificação (ΔpH/h)	pH final
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	23	0,249	0,058	4,345
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	30	0,274	0,071	4,407

O *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* atingiu a fase estacionária após as 48 horas de crescimento (Anexo V, Figura 8) e, apresentou uma taxa de crescimento de 0,115 h⁻¹. O pH final atingido foi de 4,7 e a velocidade de acidificação foi baixa, 0,023 ΔpH/h (Quadro 4.8).

Quadro 4.8. Taxa de crescimento, velocidade de acidificação e pH final do isolado *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*.

Espécie	Código do Isolado	Taxa Crescimento (h ⁻¹)	Velocidade de acidificação (ΔpH/h)	pH final
<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	(15)	0,115	0,023	4,708

4.2.6. Capacidade de crescimento a diferentes pH

É conhecido que as bactérias lácticas apresentam alguma capacidade de crescerem em ambientes com pH baixo (Thapa *et al.*, 2006) e, inversamente, em ambientes com pH elevado (Salama *et al.*, 1994; Thapa *et al.*, 2006). Sendo assim, o objectivo de realizar este teste, foi de estudar a capacidade de crescimento das bactérias do ácido láctico isoladas, em meio ácido (pH = 3,5 e 4,5) e em meio alcalino (pH = 8,5).

Após 5 dias de crescimento em meio com o pH=3,5 (Quadros 4.9 ao 4.11) o grau de turvação obtido nos tubos de ensaio em teste foi muito inferior aos respectivos tubos controle, em todos os isolados. Mesmo aguardando até ao sétimo dia de crescimento não houve alteração no grau de turvação.

O crescimento dos diferentes isolados em meio com o pH=4,5 foi variável, de 3 a 5 dias. Os isolados *Lb. rhamnosus* e *Lb. curvatus ssp. curvatus*, foram os que apresentaram um tempo de crescimento menor, 3 dias (Quadro 4.9). Os isolados *Lb. plantarum*, *Enterococcus durans* e *Pediococcus pentosaceus* levaram 4 dias em crescimento (Quadros 4.9 e 4.10) até se conseguir uma turvação semelhante aos controle. Por outro lado, o crescimento no grupo de isolados *Lb. paracasei ssp. paracasei* variou entre os 3 e 4 dias (Quadro 4.9). Os isolados de *Lc. lactis ssp. lactis* levaram 4 a 5 dias (Quadro 4.11). Por fim, o *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* foi o que apresentou um tempo de crescimento maior, 5 dias (Quadro 4.10).

Assim, comparando o crescimento dos diversos isolados, em ambientes ácidos, com o crescimento nos tubos controle (pH=5,8), conclui-se que o pH ácido influencia o crescimento das lácticas de forma negativa. Contudo, à medida que o pH sobe o tempo de crescimento diminui.

Quanto ao crescimento verificado em meio alcalino (pH=8,5) este foi bem mais rápido em relação ao verificado com meios ácidos. Quase todos os isolados levaram 1 dia a atingirem uma turvação semelhante aos controle, à excepção do *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* que levou 2 dias (Quadros 4.9 ao 4.10). Comparando o crescimento destes isolados nestas condições com o crescimento no controle (pH=5,8), verifica-se que para os isolados *Lb. curvatus ssp. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, os 8 isolados de *Lb. paracasei ssp. paracasei* e

para um isolado *Lc. lactis ssp. lactis*, este pH não influenciou o crescimento, pois o tempo de crescimento em ambos foi semelhante (Quadro 4.9 ao 4.11). Contudo, para os isolados de *Enterococcus durans*, *Lb. rhamnosus*, para 17 isolados de *Lc. lactis ssp. lactis* e quatro isolados *Lb. paracasei ssp. paracasei*, o tempo de crescimento nestas condições foi superior em relação ao controle (pH=5,8) (Quadro 4.9 ao 4.11). Por fim, para o *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* e para um isolado *Lb. paracasei ssp. paracasei* (13), o tempo de crescimento no meio alcalino foi menor em relação ao controle (Quadro 4.10 e 4.9, respectivamente).

4.2.7. Capacidade de crescimento a diferentes concentrações de NaCl

As bactérias do ácido láctico apresentam alguma capacidade de crescer em ambientes salinos (Salama *et al.*, 1994; Leisner *et al.*, 1999; Thapa *et al.*, 2006). Contudo, algumas espécies apresentam sensibilidade em ambientes com uma concentração de NaCl de 6,5%, como o *Lb. plantarum* e o *Lc. lactis ssp. lactis* (Leisner *et al.*, 1999; Thapa *et al.*, 2006). Ao realizar estes testes teve-se como objectivo estudar o crescimento das BAL em meios com diferentes concentrações de NaCl (4%, 8%, 12% e 16%).

Na concentração mais baixa de NaCl (4%), quase todos os isolados apresentaram um tempo de crescimento de 1 dia (Quadros 4.9 ao 4.11), à excepção do *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* que levou 3 dias (Quadro 4.10). No entanto, comparando estes resultados com os resultados do crescimento dos tubos de ensaio controle, verifica-se que para alguns isolados esta concentração de sal já influenciou o seu crescimento, como aconteceu no caso do *Enterococcus durans*, alguns isolados *Lb. paracasei ssp. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, quase todos os isolados da espécie *Lc. lactis ssp. lactis* e o isolado *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (Quadro 4.9 ao 4.11).

Com uma concentração de 8% NaCl no meio o tempo de crescimento variou entre 1 e 4 dias. A espécie que mostrou uma maior tolerância foi o *Lb. plantarum*, 1 dia (Quadro 4.9) e a que demonstrou ter uma sensibilidade maior foi o *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, 4 dias (Quadro 4.10). Os restantes isolados apresentaram crescimento de 2 dias (Quadro 4.9 ao 4.11), com excepção de

um isolado *Lc. lactis ssp. lactis* (35) que foi de 3 dias (Quadro 4.11). Com o aumento da concentração de sal o grau de sensibilidade dos isolados aumentou, excepto para os isolados de *Lb. plantarum* cujo crescimento se manteve igual nas concentrações de 0% e 8% (Quadro 4.9).

À concentração de 12% de NaCl os isolados *Lb. curvatus ssp. curvatus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lb. plantarum* e para 6 isolados de *Lb. paracasei ssp. paracasei* o tempo de crescimento foi de 2 dias (Quadros 4.9 e 4.10). De notar que para os dois primeiros isolados o tempo de crescimento nesta concentração de sal foi igual ao tempo de crescimento à concentração de 4% (Quadros 4.9 e 4.10). Para o isolado *Enterococcus durans*, o tempo de crescimento foi de 3 dias (Quadro 4.10). No caso dos sete isolados *Lb. paracasei ssp. paracasei*, em quase todos os isolados de *Lc. lactis ssp. lactis* e *Lb. rhamnosus* foi de 6 dias (Quadros 4.9 e 4.11). O isolado que teve um tempo de crescimento maior nestas condições (7 dias) foi o isolado 35 do *Lc. lactis ssp. lactis* (Quadro 4.11).

Quanto ao crescimento das BAL a uma concentração de 16% o tempo de crescimento foi igual para todas as espécies, 7 dias (Quadros 4.9 ao 4.11) e, mesmo assim, o grau de turvação nos tubos foi menor quando comparado com os respectivos tubos controle.

Conclui-se que à medida que a concentração de NaCl aumentou o grau de sensibilidade das bactérias lácticas isoladas também aumentou. A espécie que mostrou ser geralmente mais resistente foi o *Lb. plantarum*, pois o tempo de crescimento até à concentração de 8% foi semelhante ao do controle. Pelo contrário, a espécie mais sensível foi o *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*.

4.2.8. Capacidade de crescimento a diferentes temperaturas

As bactérias do ácido láctico têm a capacidade de crescer a diferentes temperaturas (Devriese & Pot, 1995; Simpson & Taguchi, 1995; Hammes & Vogel, 1995; Teuber, 1995; Drosinos *et al.*, 2006; Thapa *et al.*, 2006; Franciosi *et al.*, 2009), contudo, o *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* revela alguma dificuldade em crescer a temperaturas mais baixas (Hardie & Whiley, 1995). A realização deste

teste, a 15 e a 45°C, teve como objectivo a identificação das espécies e também verificar a sua capacidade de adaptação a diferentes processos fermentativos.

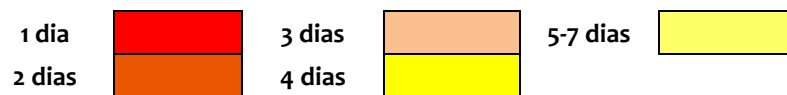
À temperatura mais baixa, 15°C, o tempo de crescimento entre os isolados foi variável, mesmo dentro do mesmo género, entre 1 e 3 dias. O isolado da espécie *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* foi o único que não conseguiu crescer a esta temperatura (Quadro 4.10). Cinco isolados de *Lc. lactis ssp. lactis* apresentaram um tempo de crescimento de 1 dia e um deles de 3 dias (Quadro 4.11), os restantes isolados apresentaram um grau de turvação semelhante ao controle após os 2 dias de crescimento (Quadros 4.9 ao 4.11).

À temperatura de 45°C, todos os isolados cresceram, contudo o tempo de crescimento também foi variável entre as diferentes espécies, entre 1 e 3 dias. Os isolados que levaram menor tempo de crescimento, 1 dia, foram os *Enterococcus durans*, *Lb. curvatus ssp. curvatus*, *Lb. paracasei ssp. paracasei*, *Lb. plantarum* e sete isolados de *Lc. lactis ssp. lactis* (Quadros 4.9 ao 4.11). Os restantes isolados, nomeadamente, *Lb. rhamnosus*, dez isolados de *Lc. lactis ssp. lactis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* levaram 2 dias a atingir o mesmo crescimento que o controlo (Quadros 4.9 ao 4.11). Por fim, apenas um isolado, *Lc. lactis ssp. lactis* (17), apresentou um tempo de crescimento de 3 dias (Quadro 4.11).

Quadro 4.9. Resultados do estudo do crescimento do grupo de lactobacilos isolados, nomeadamente, crescimento a diferentes pH, concentrações de NaCl e temperaturas.

Isolados	<i>Lb. curvatus</i> ssp <i>curvatus</i> (8)	<i>Lb. plantarum</i> (7)	<i>Lb. plantarum</i> (10)	<i>Lb. rhamnosus</i> (14)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (1)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (3)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (4)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (5)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 3 (6)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (12)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (13)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (18)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (24)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (26)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (28)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (34)	<i>Lb. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1 (38)
Condições ideais	24h	26h	26h	14h	15h	27h	27h	15h	15h	12h	34h	26h	26h	24h	24h	25h	26h
pH=3.5																	
pH=4.5																	
pH=8.5																	
4% NaCl																	
8% NaCl																	
12% NaCl																	
16% NaCl																	
15°C																	
45°C																	

Legenda. O quadro foi preenchido de acordo com a seguinte designação para o crescimento das BAL:



Quadro 4.10. Resultados do estudo do crescimento para as espécies *Enterococcus durans*, *Pediococcus pentosaceus* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, nomeadamente, crescimento a diferentes pH, concentrações de NaCl e temperaturas.

Isolados	<i>Enterococcus durans</i> (39)	<i>Enterococcus durans</i> (40)	<i>Enterococcus durans</i> (41)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (23)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (30)	<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (15)
Condições ideais	15h	15h	15h	26h	26h	52h
pH=3.5						
pH=4.5						
pH=8.5						
4% NaCl						
8% NaCl						
12% NaCl						
16% NaCl						
15°C						
45°C						

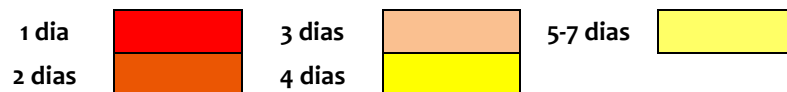
Legenda. O quadro foi preenchido de acordo com a seguinte designação para o crescimento das BAL;

1 dia		3 dias		5-7 dias	
2 dias		4 dias		Negativo	

Quadro 4.11. Resultados do estudo do crescimento para as espécies *Lactococcus lactis ssp. Lactis*, nomeadamente, crescimento a diferentes pH, concentrações de NaCl e temperaturas.

Isolados	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (2)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (9)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (11)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (16)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (17)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (19)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (20)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (21)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (22)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (25)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (27)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (29)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (31)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (32)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (33)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (35)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (36)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (37)
Condições ideais	11h	11h	11h	12h	12h	15h	15h	15h	15h	15h	13	13	13	13	13	24h	12h	11h
pH=3,5																		
pH=4,5																		
pH=8,5																		
4% NaCl																		
8% NaCl																		
12% NaCl																		
16% NaCl																		
15°C																		
45°C																		

Legenda. O quadro foi preenchido de acordo com a seguinte designação para o crescimento das BAL:



4.2.9. Produção de CO₂ a partir da glucose

As bactérias do ácido láctico não possuem geralmente a capacidade de produzir dióxido de carbono a partir da glucose (Franciosi *et al.*, 2009; Drosinos *et al.*, 2008). Os resultados obtidos foram efectivamente negativos para todas as BAL isoladas.

4.2.10. Hidrólise da Arginina

Da hidrólise da arginina no metabolismo das BAL resulta a produção de ATP e de amónia, que são utilizados como fonte de energia e promovem protecção contra ambientes ácidos (Mayo *et al.*, 2010). Por isso, foi de interesse verificar esta característica nos microrganismos isolados. Verificou-se que todos os isolados realizaram a hidrólise da arginina, após as 24h de crescimento.

4.2.11. Capacidade de acidificação

Para realização deste teste foi utilizado leite UHT gordo, com um pH=6,589, sendo este o pH inicial para todos os isolados. Após inoculação as leituras de pH foram efectuadas de 2 em 2 horas, nas primeiras 8 horas de crescimento, depois às 24 horas e às 48 horas (Franciosi *et al.*, 2009).

Entre os lactobacilos foi o *Lb. rhamnosus* que atingiu um pH final mais baixo (pH=3,8), por outro lado, o isolado com o pH mais elevado foi *Lb. plantarum* (pH=5,2) (Figura 4.4). Contudo, de uma forma geral, foram os isolados da espécie *Pediococcus pentosaceus* que obtiveram um pH final mais elevado (pH=6,1) (Figura 4.5). O *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* atingiu um pH final próximo de 4. No caso dos isolados de *Lc. lactis ssp. lactis* e *Enterococcus durans*, o pH final foi próximo de 5 (Figuras 4.4 e 4.5).

Todas as espécies, à excepção *Pediococcus pentosaceus* e do *Lb. plantarum*, coagularam o leite, a um pH abaixo de 5 (o ponto isoelétrico da caseína é de 4,6). O *Lb. curvatus ssp. curvatus*, *Lb. rhamonus*, *Enterococcus durans*, *Lc. lactis ssp. lactis* coagularam o leite às 24 horas, no entanto, no caso dos *Lb. paracasei ssp. paracasei*

e, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* aconteceu apenas às 48 horas (Figuras 4.4 e 4.5).

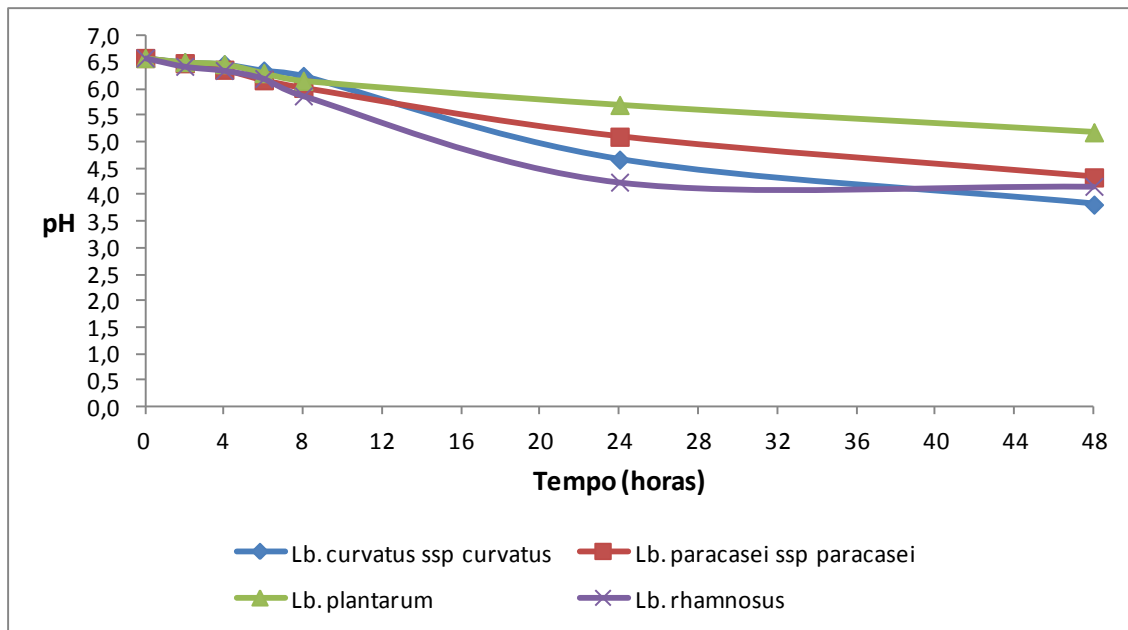


Figura 4.4. Leituras do pH em leite UHT gordo inoculado com isolados do Género *Lactobacillus*.

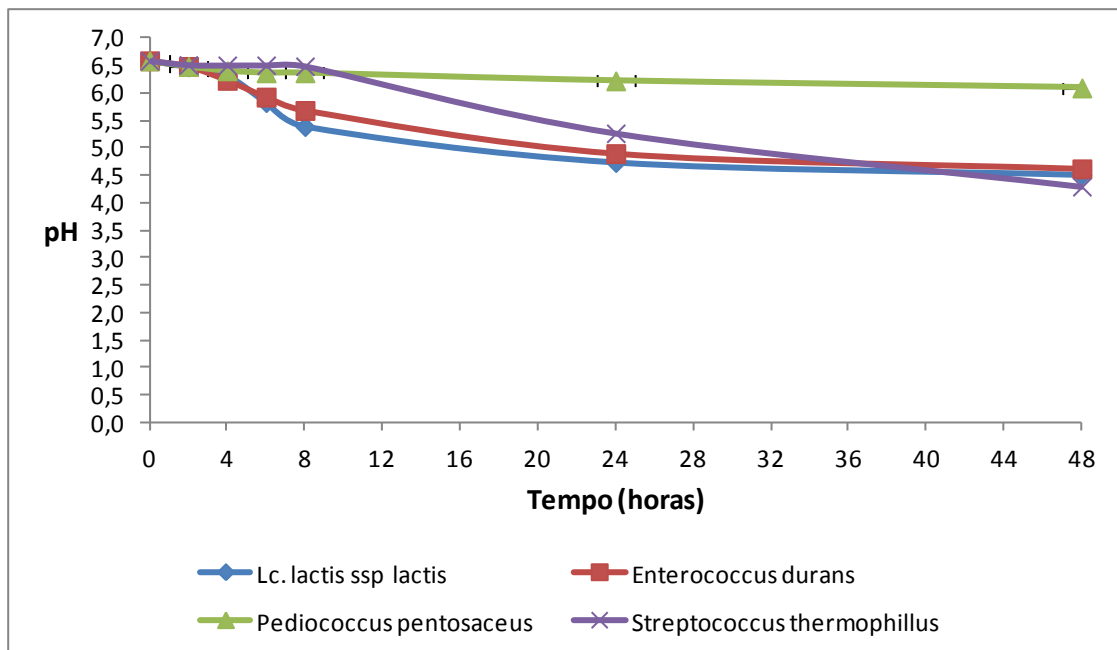


Figura 4.5. Leituras do pH em leite UHT gordo inoculado com isolados do Géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*.

4.2.12. Actividade Proteolítica

Todos os isolados apresentaram actividade proteolítica, reconhecida pela formação de um halo claro em torno das colónias (Figura 4.6), à excepção do *Pediococcus pentosaceus*. O *Lb. plantarum* apresentou actividade proteolítica fraca, apenas evidenciável nas zonas de crescimento mais denso (Quadro 4.12).

Quadro 4.12. Actividade proteolítica dos isolados BAL, verificado após 4 dias de crescimento a 37°C.

Espécie	Nº isolados	Actividade Proteolítica
<i>Lb. curvatus ssp. curvatus</i>	1	+
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>	13	+
<i>Lb. plantarum</i>	2	±
<i>Lb. rhamnosus</i>	1	+
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	18	+
<i>Enterococcus durans</i>	3	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2	-
<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	1	+

Legenda: (-) Negativo, (+) Positivo; (+?) Positivo Interrogativo.

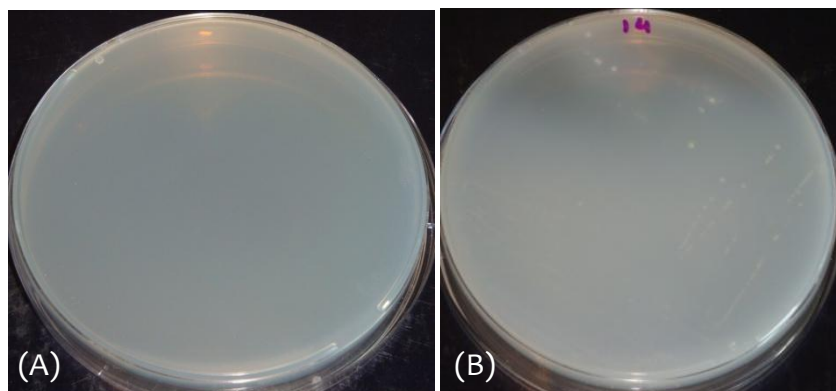


Figura 4.6. Actividade Proteolítica dos isolados de BAL (A) Negativo, (B) Positivo.

4.2.13. Produção de Diacetilo

No teste realizado algumas das espécies revelaram não serem produtoras de diacetilo, tais como, o *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, 14 dos 18 isolados da espécie *Lc. lactis ssp. lactis* e 1 isolado de *Enterococcus durans* (Quadro 4.13). Contudo, todos os isolados de *Lb. paracasei ssp. paracasei*, *Lb. curvatus ssp. curvatus*, 2 isolados *Enterococcus durans* e os restantes isolados do *Lc. lactis ssp. lactis* demonstraram produzir diacetilo como produto final do metabolismo do citrato mas, houve variação na tonalidade do anel vermelho formado entre isolados do mesmo género, revelando tal facto diversa capacidade para o produzirem, havendo assim microrganismos da mesma população que contribuem mais do que outros, com este componente, para a formação do *flavour* (Franciosi et al., 2009) (Quadro 4.13) (Anexo VI, Quadro 1, 2 e 3).

Quadro 4.13. Resultados da produção de diacetilo dos vários isolados de BAL testados (Consoante a intensidade da cor do anel formado, os resultados foram classificados de fraco, médio e forte).

Espécie	Produção de diacetilo			
	Nº de isolados			
	Negativo	Fraco	Médio	Forte
<i>Lb. curvatus ssp. curvatus</i>	0	0	1	0
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>	0	6	5	2
<i>Lb. plantarum</i>	2	0	0	0
<i>Lb. rhamnosus</i>	1	0	0	0
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	14	3	1	0
<i>Enterococcus durans</i>	1	2	0	0
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2	0	0	0
<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	1	0	0	0

4.2.14. Perfil enzimático

As bactérias do ácido láctico produzem um grande número de enzimas, glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, muito importantes pois contribuem para as características organoléticas do produto acabado, nomeadamente do queijo (Lima *et al.*, 2009; Forsythe, 2002).

Todos os isolados estudados demonstraram possuir actividade enzimática, embora uns mais do que outros (Quadro 4.14). As espécies em que foram detectadas um maior número de enzimas foram os *Lb. rhamnosus* e *Lb. plantarum*.

No caso do *Lb. rhamnosus* as enzimas presentes foram a esterase (C4); estirasse lipase (C8); leucina aminopeptidase; valina aminopeptidase; fosfatase ácida; naftol-AS-BI-fosfohidrolase; β - galactosidase; α - glucosidase. Nos dois isolados de *Lb. plantarum* foram identificadas as enzimas leucina aminopeptidase, valina aminopeptidase, cistina aminopeptidase, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, β - galactosidase, β - glucosidase e N-aetil- β - glucosaminidase.

Em todos os isolados das espécies *Lb. curvatus ssp. curvatus* e *Lc. lactis ssp. lactis* foram identificadas o mesmo grupo de enzimas: leucina aminopeptidase, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase. Quanto ao *Enterococcus durans*, foram identificadas as enzimas esterase (C4), esterase lipase (C8), leucina aminopeptidase, valina aminopeptidase, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase.

O grupo de isolados de *Lb. paracasei ssp. paracasei* apresentou as enzimas esterase (C4), esterase lipase (C8), fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase. Nos isolados de *Lc. lactis ssp. lactis* foram identificadas três enzimas, nomeadamente, leucina aminopeptidase, fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase.

Nos dois isolados da espécie *Pediococcus pentosaceus* foram identificadas quatro enzimas, leucina aminopeptidase, esterase lipase (C8), fosfatase ácida e naftol-AS-BI-fosfohidrolase. Por fim no *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* foram reconhecidas as enzimas, esterase (C4), leucina aminopeptidase e α - quimiotripsina.

Quadro 4.14. Enzimas produzidas pelas diversas BAL isoladas do soro fermento do Queijo São Jorge DOP (assinalado a verde quando positivo).

Enzimas	<i>Enterococcus durans</i> (3)	<i>Lb. curvatus</i> (1)	<i>Lb. paracasei ssp paracasei</i> (13)	<i>Lb. plantarum</i> (2)	<i>Lb. rhamnosus</i> (1)	<i>Lc. lactis ssp lactis</i> (18)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (2)	<i>Streptococcus salivarius ssp. termophilus</i> (1)
Fosfatase alcalina								
Esterase (C4)								
Esterase Lipase (C8)								
Lipase (C14)								
Leucina aminopeptidase								
Valina aminopeptidase								
Cistina aminopeptidase								
Tripsina								
α -quimiotripsina								
Fosfatase ácida								
Naftol-AS-BI-fosfohidrolase								
α -galactosidase								
β -galactosidase								
β -glucuronidase								
α -glucosidase								
β -glucosidase								
N-aetil- β -glucosaminidase								
α -manosidase								
α -fucosidase								

4.2.15. Actividade Antimicrobiana das BAL

Um das preocupações da tecnologia alimentar é evitar o crescimento de patógenos no alimento, por este motivo, foi de interesse estudar a actividade antimicrobiana (AT) das várias espécies de BAL em relação à *Listeria monocytogenes* e ao *Staphylococcus aureus*, dois agentes patogénicos com frequência presentes no queijo. Testou-se assim, a AT da cultura mais o sobrenadante (cultura mãe) e da cultura sem o sobrenadante; do sobrenadante, com e sem o pH ajustado a 6,5 e do sobrenadante com tratamento térmico (TT).

4.2.15.1. Actividade Antimicrobiana em relação à *Listeria monocytogenes*.

A actividade antimicrobiana no grupo de lactobacilos em relação à *Listeria monocytogenes*, foi positiva para todos os isolados no teste cultura mais sobrenadante e na cultura sem o sobrenadante, sendo os valores dos halos semelhantes entre si. Contudo, para o teste do sobrenadante apenas 7 isolados foram positivos: 2 isolados de *Lb. plantarum*; 1 isolado de *Lb. curvatus ssp. curvatus* e 4 isolados de *Lb. paracasei ssp. paracasei* (Quadro 4.15). Destes 7 isolados positivos no teste ao sobrenadante houve 4 isolados que apresentaram uma AT superior aos outros 3, designadamente, os 2 isolados *Lb. plantarum*, o isolado de *Lb. curvatus ssp. curvatus* e o isolado *Lb. paracasei ssp. paracasei* (Quadro 4.15). Quanto aos resultados do teste sobrenadante com o pH ajustado a 6,5, à excepção do isolado 24 do *Lb. paracasei ssp. paracasei*, todos eles foram positivos (Quadro 4.18). Contudo, nestes casos houve um decréscimo nos diâmetros dos dos halos de inibição em relação ao sobrenadante normal, comprovando-se assim, haver inibição pela acidez do sobrenadante. Para o teste sobrenadante com tratamento térmico todos os isolados foram positivos, mas o diâmetro do halo de inibição foi semelhante ao do sobrenadante (Quadro 4.18), confirmando a inibição por parte da acidez e não devido à presença de proteínas no meio.

Dos 18 isolados de *Lc. lactis ssp. lactis*, 17 apresentaram halos de inibição nos testes cultura mais o sobrenadante e cultura sem o sobrenadante mas, destes, apenas 5 isolados foram positivos para o teste sobrenadante (Quadro 4.16). No

teste sobrenadante com pH=6,5 quase todos foram positivos (Quadro 4.18). Analisando o quadro observa-se que, em todos os isolados houve um decréscimo no valor dos halos de inibição em relação ao sobrenadante normal e, num dos isolados, 16, não houve inibição, o que nos indica que o pH ácido do sobrenadante é um factor de AT. No teste sobrenadante com TT também quase todos os isolados foram positivos (Quadro 4.18), mas em 3 isolados, nomeadamente, 2, 11 e 16, houve um decréscimo dos valores dos halos, demonstrando que quando houve a desnaturação das proteínas existiu uma diminuição nos valores dos halos de inibição e, no caso do isolado 9, não ocorreu AT, sendo assim forte indicador que actividade antimicrobiana se deve a um composto de natureza proteica que se desnatura durante o tratamento térmico.

Para os 3 isolados de *Enterococcus durans* e para os dois isolados de *Pediococcus pentosaceus* a AT foi positiva em relação à *Listeria monocytogenes* só para os testes cultura mais sobrenadante e cultura sem o sobrenadante, (Quadro 4.17). Havendo neste caso inibição apenas devido ao contacto célula a célula, BAL e patógene. O isolado de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* não apresentou AT em relação à *Listeria monocytogenes*.

Quadro 4.15. Comparação dos halos de inibição (em mm) revelando a actividade antimicrobiana dos isolados *Lactobacilos* em relação à *Listeria monocytogenes*.

Isolados	<i>Lact. curvatus ssp curvatus</i> (8)	<i>Lact. plantarum</i> (7)	<i>Lact. plantarum</i> (10)	<i>Lact. rhamnosus</i> (14)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (1)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (3)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (4)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (5)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 3</i> (6)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (12)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (13)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (18)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (24)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (26)
Cultura + Sobrenadante	7,100 ± 0,950	8,083 ± 1,702	6,750 ± 0,661	5,083 ± 1,041	4,000 ± 0,500	6,083 ± 0,144	5,333 ± 0,382	4,250 ± 0,661	5,167 ± 0,878	4,583 ± 0,144	5,000 ± 0,000	3,667 ± 0,289	5,250 ± 0,500	3,333 ± 0,382
Cultura	6,000 ± 0,140	6,417 ± 1,010	7,000 ± 0,433	4,750 ± 0,500	3,667 ± 0,722	5,750 ± 0,433	4,167 ± 0,629	4,500 ± 0,500	4,750 ± 1,323	4,500 ± 1,323	4,167 ± 1,665	3,500 ± 0,500	4,750 ± 0,000	2,667 ± 0,144
Sobrenadante	3,700 ± 0,380	4,250 ± 0,250	4,333 ± 0,577	-	2,000 ± 0,433	3,500 ± 0,661	2,000 ± 0,661	-	-	-	-	-	1,167 ± 0,289	-

Quadro 4.16. Comparação dos halos de inibição (em mm) revelando a actividade antimicrobiana dos isolados *Lc. lactis ssp. lactis* em relação à *Listeria monocytogenes*.

Isolados	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (2)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (9)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (11)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (16)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (17)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (19)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (20)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (21)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (22)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (27)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (29)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (31)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (33)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (35)
Cultura + Sobrenadante	4,083 ± 0,520	5,500 ± 1,3229	5,000 ± 1,250	4,833 ± 1,607	3,667 ± 1,377	2,750 ± 1,639	3,833 ± 1,041	0,275 ± 1,299	0,250 ± 0,500	3,417 ± 0,382	3,000 ± 0,000	2,667 ± 0,382	2,333 ± 0,144	2,500 ± 0,250
Cultura	3,492 ± 0,440	4,500 ± 1,000	4,250 ± 0,661	4,333 ± 1,155	3,083 ± 1,665	3,000 ± 1,000	3,667 ± 1,155	0,300 ± 1,732	0,208 ± 0,382	3,333 ± 0,382	2,833 ± 0,289	2,333 ± 0,577	2,167 ± 0,289	2,167 ± 0,289
Sobrenadante	1,750 ± 0,661	1,333 ± 1,181	2,667 ± 0,946	3,000 ± 0,000	3,000 ± 0,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 4.17. Comparação dos halos de inibição (em mm) revelando actividade antimicrobiana dos isolados de *Enterococcus durans* e *Pediococcus pentosaceus* em relação à *Listeria monocytogenes*.

Isolados	<i>Enterococcus durans</i> (39)	<i>Enterococcus durans</i> (40)	<i>Enterococcus durans</i> (41)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (23)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (30)
Cultura + Sobrenadante	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	2,583 ± 0,520	2,250 ± 0,443
Cultura	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	2,500 ± 0,500	2,583 ± 0,520
Sobrenadante	-	-	-	-	-

Quadro 4.18. Caracterização do tipo de actividade antimicrobiana (halos em mm) dos Lactobacilos e *Lc. lactis ssp. lactis* contra a *Listeria monocytogenes* (testes do sobrenadante, sobrenadante com o pH=6,5 e sobrenadante c/ tratamento térmico. As células coloridas a amarelo evidenciam os resultados mais expressivos).

Isolados	<i>Lact. curvatus ssp curvatus</i> (8)	<i>Lact. plantarum</i> (7)	<i>Lact. plantarum</i> (10)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (1)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (3)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (4)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (24)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (2)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (9)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (11)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (16)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (17)
pH final	3,849	3,741	3,736	4,565	3,86	4,007	4,345	4,289	4,19	4,177	4,278	4,274
Sobrenadante	3,700 ± 0,380	4,250 ± 0,250	4,333 ± 0,577	2,000 ± 0,433	3,500 ± 0,661	2,000 ± 0,661	1,167 ± 0,289	1,750 ± 0,661	1,333± 1,181	2,667 ± 0,946	3,000 ± 0,000	3,000 ± 0,000
Sobrenadante com pH=6.5	1,500 ± 0,140	1,250 ± 0,144	1,917 ± 0,289	0,608 ± 0,283	2,000 ± 0,520	2,233 ± 0,433	-	1,083 ± 0,433	0,299 ± 0,083	1,000 ± 0,289	-	0,583 ± 0,000
Sobrenadante com Tratamento térmico	3,667 ± 0,290	4,833 ± 0,946	4,083 ± 1,041	2,583 ± 0,804	3,333 ± 0,144	2,183 ± 0,144	2,833 ± 0,520	1,333 ± 0,878	-	1,917 ± 0,577	2,333 ± 0,577	3,000 ± 0,000

4.2.15.2. Actividade Antimicrobiana em relação ao *Staphylococcus aureus*

A AT no grupo de lactobacilos para o patógene *Staphylococcus aureus*, foi positiva apenas para 9 dos 17 isolados, para os testes cultura mais sobrenadante e cultura, nomeadamente, para os isolados *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus ssp. curvatus*, para os isolados de *Lb. plantarum* e para 5 isolados de *Lb. paracasei ssp. paracasei* (Quadro 4.19). O mesmo aconteceu para o grupo *Lc. lactis ssp. lactis* em que, apenas 10 dos 18 isolados apresentaram halos de inibição (Quadro 4.20) e para os dois isolados da espécie *Pediococcus pentosaceus* (Quadro 4.21). Para o teste do sobrenadante todos os isolados foram negativos.

Sendo assim, conclui-se que a actividade antimicrobiana ocorre apenas devido ao contacto célula a célula, BAL e patógene. Os isolados da espécie *Enterococcus durans* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* não apresentaram AT em relação ao *Staphylococcus aureus*.

Quadro 4.19. Actividade antimicrobiana (halos em mm) dos isolados Lactobacilos em relação ao *Staphylococcus aureus*.

Isolados	<i>Lact. curvatus ssp curvatus</i> (8)	<i>Lact. plantarum</i> (7)	<i>Lact. plantarum</i> (10)	<i>Lact. rhamnosus</i> (14)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (3)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (4)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (13)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (26)	<i>Lact. paracasei ssp paracasei 1</i> (38)
Cultura + Sobrenadante	0,667 ± 0,150	3,167 ± 0,289	4,500 ± 2,598	3,667 ± 0,520	1,876 ± 1,083	1,299 ± 0,750	1,590 ± 0,917	1,083 ± 0,140	1,833 ± 0,144
Cultura	-	1,155 ± 0,667	1,750 ± 0,661	3,000 ± 0,661	-	-	1,500 ± 1,392	1,083 ± 0,382	-
Sobrenadante	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 4.20. Actividade antimicrobiana (halos em mm) dos isolados de *Lc. lactis ssp. lactis* em relação ao *Staphylococcus aureus*.

Isolados	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (2)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (9)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (11)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (16)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (17)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (29)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (31)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (33)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (36)	<i>Lc. lactis ssp lactis 1</i> (37)
Cultura + Sobrenadante	2,083 ± 0,144	1,833 ± 0,289	2,083 ± 0,289	2,000 ± 0,000	2,083 ± 0,144	1,500 ± 0,500	0,877 ± 0,125	1,833 ± 0,289	1,000 ± 0,000	0,833 ± 0,289
Cultura	2,000 ± 0,866	2,917 ± 0,629	2,333 ± 0,144	2,000 ± 0,000	1,333 ± 0,577	1,667 ± 0,577	1,250 ± 0,661	2,500 ± 0,500	1,250 ± 0,433	1,500 ± 0,500
Sobrenadante	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Quadro 4.21. Comparação dos halos de inibição (mm) da actividade antimicrobiana dos isolados das espécies *Enterococcus durans* e *Pediococcus pentosaceus*, para o patógene *Staphylococcus aureus*, em relação aos testes cultura mais meio fresco, cultura e sobrenadante.

Isolados	<i>Enterococcus durans</i> (39)	<i>Enterococcus durans</i> (40)	<i>Enterococcus durans</i> (41)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (23)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (30)
Cultura + Sobrenadante	-	-	-	1,917 ± 0,629	1,000 ± 0,000
Cultura	-	-	-	3,500 ± 0,250	2,000 ± 0,000
Sobrenadante	-	-	-	-	-

4.2.16. Resistência aos Antibióticos

Os resultados do antibiograma realizado aos isolados puros dos antibióticos encontram-se resumidos no Quadro 4.22. De acordo com as referências, os isolados foram classificados em (S) sensíveis, (I) sensibilidade intermediária e (R) de resistentes.

Uma grande proporção dos isolados revelaram ser resistentes à maior parte dos antibióticos testados. Todos os isolados de *Lb. paracasei ssp. paracasei*, mostraram ser resistentes ao cloranfenicol, ampicilina, gentamicina, penicilina, norfloxacin e rifampicina, apenas 4 isolados foram sensíveis à clindamicina; 3 isolados resistentes ao sulfametoxazole/trimetropina e 1 isolado sensível à eritromicina.

Os dois isolados de *Lb. plantarum* mostraram ser resistentes à maioria dos antibióticos, à exceção de 1 um deles que mostrou uma sensibilidade intermédia ao sulfametoxazole/trimetropina.

O *Lb. rhamnosus* apenas mostrou sensibilidade intermédia para o antibiótico eritromicina, sendo resistente aos restantes.

Dos 18 isolados da espécie *Lc. latiss ssp. lactis* todos mostraram resistência aos antibióticos cloranfenicol, lincomicina e rifampicina. Alguns dos isolados desta espécie revelaram sensibilidade à eritromicina, gentamicina, penicilina, à ampicilina, norflaxina e sulfametoxazole/trimetropina; e sensibilidade intermédia à eritromicina, gentamicina, à clindamicina e sulfametoxazole/trimetropina.

No caso dos *Enterococcus durans*, todos os isolados foram resistentes à maioria dos antibióticos, apenas um isolado mostrou sensibilidade para os antibióticos eritromicina e gentamicina.

Os dois isolados de *Pediococcus pentosaceus* apresentaram sensibilidade intermédia apenas à eritromicina sendo resistentes aos restantes antibióticos.

O isolado de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* mostrou ser resistente a todos os antibióticos utilizados.

Quadro 4.22. Perfil de sensibilidade a 10 antibióticos, classificando os isolados das BAL em (S) sensíveis, (I) de sensibilidade intermédia e resistentes (R), em função dos valores de referência do CLSI e do CASFM para bactérias pertencentes aos mesmos géneros.

Estirpe	Antibióticos																													
	Cloranfenicol			Clindamicina			Eritromicina			Ampicilina			Gentamicina			Penicilina			Norfloxacina			Sulfametoxazol/ Trimetoprim			Lincomicina			Rifampicina		
	Nº de Isolados			Nº de Isolados			Nº de Isolados			Nº de Isolados			Nº de Isolados			Nº de Isolados			Nº de Isolados			Nº de Isolados			Nº de Isolados					
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<i>Lb. curvatus ssp curvatus</i>	-	-	1	-	-	1	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
<i>Lb. paracasei ssp paracasei</i>	-	-	13	-	4	9	-	1	12	-	-	13	-	-	13	-	-	13	-	-	13	-	3	10	-	-	13	-	-	13
<i>Lb. plantarum</i>	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	1	1	-	-	2	-	-	2
<i>Lb. rhamnosus</i>	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1
<i>Lc. lactis ssp lactis</i>	-	-	18	2	1	15	1	10	7	1	-	17	2	5	11	2	-	16	1	-	17	-	1	17	-	-	18	-	-	18
<i>Enterococcus durans</i>	-	-	3	-	-	3	-	1	2	-	-	3	-	1	2	-	-	3	-	-	3	-	3	-	-	-	3	-	-	3
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	-	2	-	-	2	-	2	-	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2	-	-	2
<i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1

5. Discussão

O Queijo São Jorge DOP é um queijo típico e tradicional da ilha de São Jorge, um produto emblemático dos lacticínios açorianos, que adquiriu fama através das suas características organolépticas únicas, no entanto, poucos tem sido os trabalhos desenvolvidos para o estudo da sua microflora láctica. Queijos como este fabricados a partir do leite cru possuem uma flora natural constituída, por um lado, por bactérias lácticas, responsáveis em parte pelo seu sabor e aromas característicos de cada variedade, mas também, eventualmente, por bactérias patogénicas, como Coliformes, Salmonela, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, entre outras. Por este motivo é importante que haja actividade antimicrobiana por parte da microflora láctica de modo a inibir a sobrevivência e o crescimento dos patógenos indesejáveis.

Neste trabalho, dos 83 isolados BAL identificados a partir do “sorofermento”, foram selecionados 41: *Lactobacillus curvatus* ssp. *curvatus*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus durans* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, sendo as espécies mais frequentemente isoladas o *Lb paracasei* ssp. *paracasei* e o *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Estes resultados estão de acordo com os observados num estudo realizado sobre o mesmo queijo por Kongo (2007). No entanto, o autor menciona outras espécies como o, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, que não foram isoladas no presente trabalho. O isolamento em laboratório de culturas puras de bactérias lácticas, que vivem em natureza, normalmente em simbiose, é muito difícil, pois umas espécies necessitam das outras para o seu crescimento, nomeadamente de nutrientes que são libertados no meio como resultado do metabolismo pelas suas simbioses (Biscaia et al., 2004).

Apesar dos *Enterococcus* serem geralmente considerados como indesejáveis nos alimentos, não foram descartados no nosso estudo, pois possuem características bioquímicas, nomeadamente, a actividade proteolítica e lipolítica, que contribuem significativamente para a tipicidade organoléptica dos queijos, pelo

que são considerados constituintes normais da microflora de muitos queijos tradicionais produzidos no Sul da Europa (Moreno *et al.*, 2006; Kongo, 2009).

Ao estudar a taxa de crescimento dos vários isolados verificou-se não haver uma correlação entre os valores observados e a espécie, pois os isolados que apresentaram maiores taxas de crescimento pertenciam a diferentes espécies: *Lc. lactis* ssp. *lactis* ($0,374 \text{ h}^{-1}$), seguindo-se o *Enterococcus durans* ($0,344 \text{ h}^{-1}$), o *Lb. rhamnosus* ($0,310 \text{ h}^{-1}$) e o *Pediococcus pentosaceus* ($0,274 \text{ h}^{-1}$). O mesmo se verificou para os isolados que obtiveram uma taxa de crescimento menor: o *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* ($0,115 \text{ h}^{-1}$) e um isolado da espécie *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* ($0,102 \text{ h}^{-1}$). Por outro lado, entre os isolados da mesma espécie também se verificou uma grande variabilidade no que respeita à taxa de crescimento, e.g. o isolado 26 ($0,096 \text{ h}^{-1}$) e o isolado 13 ($0,045 \text{ h}^{-1}$) da espécie *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* 1.

Um ponto importante no início do processo de fabricação do queijo é a rápida acidificação do leite, de forma a evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis. Por isso foi de interesse estudar qual das espécies revelava uma maior velocidade de acidificação. Verificou-se que, tal como nas taxas de crescimento, não existiu uma correlação relativamente a este parâmetro entre espécies e mesmo entre os isolados da mesma espécie. Os isolados com uma maior velocidade de acidificação, após as 24 horas de crescimento, foram o *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* e o *Lb. plantarum* ($0,096 \Delta\text{pH/h}$), contudo foi o isolado da espécie *Lb. plantarum* que obteve um pH final mais baixo (3,7). Por outro lado, foi o *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* que revelou uma menor velocidade de acidificação ($0,023 \Delta\text{pH/h}$) e também um pH final mais elevado (4,7). Verificou-se também que os isolados com maior velocidade de acidificação foram os que apresentaram maiores variações de pH.

Quando se avaliou a capacidade de acidificação em leite gordo UHT o *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* manteve esta característica tendo sido um dos que apresentou um pH, às 4h, mais baixo (6,4), sendo os isolados da espécie *Enterococcus durans* e *Lc. lactis* ssp. *lactis* os que apresentaram uma acidificação maior, com pH de 6,2 e 6,3, respectivamente. As espécies com uma capacidade de

acidificação inicial mais rápida, devem ser propostas como constituintes de cultura de arranque, porque ao baixarem mais rapidamente o pH do leite evitam o crescimento e/ou desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. No entanto, após as 48h foi a espécie *Lb. curvatus ssp. curvatus* que obteve o pH mais baixo (pH=3,82), seguindo-se o *Lb. rhamnosus* (pH= 4,16) e do *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (pH= 4,29). Estes resultados vão ao encontro dos obtidos por Franciosi *et al.*, (2009), num estudo sobre a biodiversidade e o potencial tecnológico das bactérias do ácido láctico selvagens a partir de leite de vaca cru.

Uma vez que a inibição dos microrganismos patogénicos é uma das questões mais importantes quando se trata do fabrico de queijo a partir do leite cru, o caso do Queijo São Jorge DOP, testou-se a actividade antimicrobiana dos diferentes isolados em relação a dois microrganismos patogénicos de origem alimentar a *Listeria monocytogenes*, um psicrófilo, com capacidade de crescer no leite em condições de refrigeração (Swaminathan, 2001) e o *Staphylococcus aureus*, um dos principais responsáveis por mamites nas vacas leiteiras e consequentemente quase sempre presentes no leite cru (Vintov, 2003).

Verificou-se que o *Lb. plantarum* foi o que apresentou uma maior capacidade de inibição tanto da *L. monocytogenes* como do *S. aureus*, com halos de inibição de 8,1 mm e 4,3 mm, respectivamente. O *S. aureus* foi o que se revelou menos sensível, além de que nenhum isolado foi capaz de inibi-lo quando se testou a actividade apenas dos sobrenadantes, sugerindo que o mecanismo de inibição exige o contacto directo das BAL com o patógeno. Em relação à *L. monocytogenes*, apesar dos sobrenadantes continuarem a exercer actividade, o tamanho dos halos de inibição diminuiu em todos os isolados testados, o que confirma que a presença das BAL desempenha um papel importante na actividade antimicrobiana exibida.

Uma vez que o *Lb. plantarum* foi o que apresentou uma maior actividade e, ao mesmo tempo, foi o isolado com um valor de pH final da cultura mais baixo (3.7), achou-se pertinente avaliar até que ponto a actividade antimicrobiana se devia ao abaixamento do pH, tendo para o efeito sido testado o sobrenadante com o pH acertado a 6,5 verificando-se que efectivamente a actividade decresceu bastante. O mesmo se constatou em relação ao *Lb. curvatus ssp. curvatus*, tendo mesmo em

alguns casos a actividade se perdido completamente, e.g. para o *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* e para o *Lc. lactis* ssp. *lactis*, o que numa primeira análise poderia significar que nestes casos a actividade antimicrobiana do sobrenadante em relação à *L. monocytogenes* se deveu apenas à acidez. Os isolados da espécie *Lc. lactis* ssp. *lactis* foram os únicos em que sobrenadante perdeu a actividade após o tratamento térmico, o que é um forte indicador de que actividade antimicrobiana se devia a um composto de natureza proteica que se desnaturou com o tratamento térmico, uma bacteriocina. De facto, há estudos que demonstram que a actividade das bacteriocinas é favorecida a pH baixo (Jack et al., 1995; Stiles, 1996). O aumento da carga líquida da bacteriocina para valores de pH baixo pode facilitar a sua translocação através da parede celular. A solubilidade de bacteriocina também pode aumentar a pH mais baixo, facilitando a sua difusão. Buncic et al., (1995) constataram que a sensibilidade da *L. monocytogenes* à nisina (400 UI/ml) aumentou em combinação com ácido láctico.

Para além de terem a capacidade de acidificar o meio, as bactérias do ácido láctico devem também ser ácido-tolerantes por forma, a sobreviverem durante o processo de fabrico e manterem-se viáveis até à maturação dos queijos. As espécies que melhor resistiram ao pH ácido foram *Lb. curvatus* ssp. *curvatus*, *Lb. rhamnosus*, quase todos os isolados da espécie *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, seguindo-se o *Lb. plantarum* e o *Enterococcus durans*.

Outra barreira tecnológica, que os microrganismos têm que superar durante o fabrico do queijo, é a salga, pelo que se avaliou a capacidade de crescimento dos diferentes isolados em meios com concentrações crescentes de NaCl. A espécie *Lb. plantarum* foi a que apresentou melhor crescimento nas concentrações de sal de 8% e 12%, seguindo-se o *Lb. curvatus* ssp. *curvatus*, alguns isolados da espécie *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* e o *Pediococcus pentosaceus*. As BAL apresentam alguma capacidade de crescer em ambientes salinos, contudo, algumas espécies são inibidas para concentrações superior 6,5% de NaCl (Salama et al., 1994; Leisner et al., 1999 e Thapa et al., 2006).

Além da capacidade de poderem sobreviver durante o processo de fabrico do queijo, outras características das BAL que se referem a alguns aspectos

tecnológicos são igualmente importantes. Neste sentido avaliou-se a probabilidade destas contribuírem para o aparecimento de “olhos” no queijo, uma característica, que resulta da produção de CO₂ a partir da glucose (Franciosi *et al.*, 2009; Drosinos *et al.*, 2008). Verificou-se que nenhum dos isolados apresentou esta característica metabólica. Na hidrólise da arginina todos os isolados foram positivos, o que se encontra de acordo com dados publicados por outros autores (Franciosi *et al.*, 2009; Thapa *et al.*, 2006, Drosinos *et al.*, 2006; Salama *et al.*, 1995). Indicando que os isolados estudados utilizam-na como fonte de energia e são capazes de se proteger contra ambientes ácidos (Mayo *et al.*, 2010). No entanto, Franciosi *et al.*, (2009) menciona que o resultado positivo para a espécie *Streptococcus thermophilus* não é típico.

O diacetilo é um produto que resulta do metabolismo do citrato em algumas BAL e contribui para a formação do *flavour*. No teste realizado, as espécies positivas para este metabolito foram o *Lb. curvatus ssp. curvatus*, alguns isolados das espécies *Lb. paracasei ssp. paracasei*, *Lc. lactis ssp. lactis* e *Enterococcus durans*. O facto de alguns isolados das espécies *Lc. lactis ssp. lactis* e *Enterococcus durans* serem positivos e outros não, também foi observado noutro estudo (Franciosi *et al.*, 2009).

Durante a actividade proteolítica das BAL são libertados para o meio extracelular aminoácidos livres e pequenos peptídeos que são importantes para o crescimento bacteriano, promovendo uma rápida acidificação do meio durante a fermentação e que funcionam como precursores para o desenvolvimento do sabor (Gobbetti, 1998). No teste da actividade proteolítica, à excepção do *Pediococcus pentocaseus*, todos os isolados foram positivos, contudo, os *Lb. plantarum* apenas foram positivos em zonas de maior densidade de microrganismos, pelo que se questiona a sua capacidade proteolítica. Simsek *et al.*, (2006) também concluíram que os *Lb. plantarum* apresentavam uma actividade proteolítica fraca.

As BAL produzem um grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas (Lima *et al.*, 2009) que contribuem para as características organolépticas dos queijos. A presença de esterases é importante, uma vez que, contribui para ao desenvolvimento do aroma (Moreno *et al.*, 2006), bem como

também a produção de aminopeptidases que contribuem para o fortalecimento do gosto do queijo (Gelsomino *et al.*, 2001).

De uma forma geral, algumas espécies do género *Lactobacillus*, *Enterococcus durans*, *Pediococcus pentosaceus* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* produzem esterases. Ao contrário do que foi mencionado por Kongo (2007), nenhuma das espécies isoladas produziu lipases, no entanto, nos resultados do mesmo autor, ele menciona que os *Enterococcus durans* apresentam esta capacidade. À excepção do *Lb. paracasei ssp. paracasei*, em todas as espécies foi identificada a produção de aminopeptidases, sendo o *Lb. plantarum* a única que apresentou a presença das três enzimas, leucina, valina e cistina aminopeptidase. Tal como Kongo (2007), nenhum isolado da espécie *Enterococcus durans* produziu cistina aminopeptidase, mas sim leucina e valina aminopeptidase. Apenas as espécies de *Lb. plantarum* e *Lb. rhamnosus* produziram a enzima β -galactosidase, porém outros autores, como Suzzi *et al.*, (2000) e Kongo (2007) referem que os isolados da espécie *Enterococcus durans* apresentam capacidade de produzir esta enzima.

As bactérias do ácido láctico são os microrganismos mais utilizados como probióticos (Badrinon & Labitte, 2010) e uma flora intestinal rica em organismos probióticos contribui para a exclusão competitiva dos microrganismos patogénicos (Barton & Hart, 2001). A possibilidade de transmissão dos genes de resistência aos antibióticos, por parte das bactérias do ácido láctico às espécies patogénicas, ou potencialmente, deve constituir uma preocupação na selecção e segurança das espécies com acção probiótica, ou mesmo quando utilizadas como cultura de arranque (Danielsen & Wind, 2003).

No teste de sensibilidade aos antibióticos verificou-se que a maior parte das espécies eram resistentes aos 10 antibióticos testados. A totalidade das espécies mostraram-se resistentes ao cloranfenicol; 97,56% à rifampicina e à lincomicina; 95,12% à norfloxicina e à ampicilina; 92,68% à penicilina; 82,93% à clindamicina; e 78,05% à gentamicina e ao sulfametoxazole/trimetropina. Apresentaram uma maior sensibilidade intermédia à eritromicina (63,41%). Com base nestes resultados, podemos concluir que a maioria dos isolados são bons candidatos a agentes

probióticos, a utilizar em situações de reconstituição da flora intestinal, dada a sua resistência à generalidade dos antibióticos usados. Contudo, a possibilidade de transferência dos genes de resistência aos antibióticos das BAL para agentes patogénicos deve constituir uma preocupação que implica a necessidade de se realizarem estudos adicionais (Barton & Hart, 2001).

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que as espécies mais vantajosas a serem utilizadas como cultura de arranque, resultando na produção rápida de ácido láctico, por forma, a ultrapassar as primeiras barreiras do fabrico do queijo revelaram ser o *Lb. plantarum*, o *Lb. paracasei ssp. paracasei* e o *Lb. curvatus ssp. curvatus*. Contudo, também se deve considerar o *Lc. lactis ssp. lactis* devido à capacidade de inibição do patógene *Listeria monocytogenes*, através de bacteriocinas libertadas para o meio, sendo assim, uma barreira para estes microrganismos.

Relativamente às características tecnológicas, os isolados mais interessantes foram o *Lb. curvatus ssp. curvatus*, *Lb. rhamnosus* e o *Lb. paracasei ssp. paracasei*, sendo de entre os isolados estudados aqueles que obtiveram os melhores resultados na maior parte dos os testes realizados. Contudo, espécies como o *Enterococcus durans*, *Lc. lactis ssp. lactis* e o *Lb. plantarum* também deveriam ser considerados, visto que apresentam propriedades tecnológicas importantes, tais como a produção da β -galactosidase, pelo *Lb. plantarum*, hidrólise da arginina, produção de diacetil, actividade proteolítica, bem como a capacidade de acidificação, podendo também contribuir para as características organolépticas do queijo.

Todas as espécies isoladas serão eventualmente importantes para a formação de uma futura cultura de arranque, que substitua o actual uso de “soro-fermento”, por vezes contaminado com bacterias patogénicas, porque todas elas contribuem de uma forma ou de outra para diferentes aspectos do processo de fabrico do Queijo São Jorge DOP. Umas, com maiores atributos para o início do fabrico, como o *Enterococcus durans*, o *Lc. lactis ssp. lactis*, *Lb. rhamnosus*, outras para o final, como o *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* e o *Pediococcus pentosaceus*, e outras em todas as etapas, como o *Lb. paracasei ssp. paracasei*, *Lb. curvatus ssp. curvatus*, *Lb. plantarum*, sendo todas importantes para as características finais do queijo.

Algumas estirpes de espécies identificadas, tais como, o *Lb. plantarum*, o *Lb. rhamnosus*, e o *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, estão referenciadas na

literatura como sendo probióticos (Dhillon *et al.*, 2007; Mathur & Singh, 2005). Será por isso de interesse verificar futuramente se esse é o caso de alguns destes isolados do Queijo São Jorge DOP, pois se tal fosse confirmado, seria uma mais-valia para a sua comercialização, dados os possíveis benefícios para a saúde e bem-estar do consumidor.

Como nota final, foi recomendado recentemente que o estudo da sensibilidade aos antibióticos para as bactérias do ácido láctico passe a ser feito pelo método de diluição em caldo, uma vez que estas apresentam dificuldade em crescer em agar Mueller-Hinton (EUCAST, 2011).

7. Bibliografia

- Abee, T.; Krockel, L.; & Hill, C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol* 28:169-85;
- Adda, J.; Gripon, J.C.; & Vassal, L. 1982. The chemistry of flavor and texture generation in cheese. *Food Chem* 9: 115-29;
- Alakomi, H.L.; Skyttä, E.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Latva-Kala, K.; & Helander, I.M. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2001-2005;
- Ammor, M.S.; Florez, A.B.; Van Hoek, A.H.; Los Reyes-Gavilan, C.G.; Aarts, H.J.; Margolles, A.; & Mayo, B. 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 14: 6-15;
- Arena, M.E.; & Manca, de Nadra M.C. 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J Appl Microbiol* 90: 158-162;
- Aslim, B.; & Beyatli, Y. 2004. Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yogurts. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 28, 257-263;
- Avellar, J.C.S. 1902. Ilha de São Jorge: Apontamentos para a sua História, Horta: Tipografia Minerva Insulana;
- Awad, S.; Ahme, N.; & Soda, M. 2007. Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development. *Food Chemistry.* 104: 1192-1199;
- Baird-Parker, A. C. 1990. The Staphylococci: an introduction. *J. of Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, 1S-8S;
- Barton, M.D.; & Hart, W.S. 2001. Public health risks: antibiotic resistance- review. *Asian-Aust. J. Animal Science*, 14, 414-422,
- Bassit, N.; Boquien, C.Y.; Picque, D.; & Corrieu, G. 1993. Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Appl Environ Microbiol.* 59: 1893-1897;
- Batrinon, A.; & Labitte, T. 2010. The use of Lactic Acid Bacteria in Probiotic Products. 17-27;
- Beijerinck, M.W. 1901. Sur les ferments lactiques de l'industrie. *Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles (Section 2).* 6: 212-243;
- Bekal, S.; van Beeumen, J.; Garmyn, D.; Heinini, S.; Diviès, C.; & Prévost, H. 1998. Purification of *Leuconostoc mesenteroides* citrate lyase and cloning and characterization of the citCDEF gene cluster. *J Bacteriol.* 180: 647-654;
- Belletti, N.; Gatti, M., Bottari, B.; Neviani, E.; Tabanelli, G.; & Garddini, F. 2009. Antibiotic Resistance of *Lactobacilli* Isolated from Two Italian Hard Cheeses. *Journal of Food Protection.* Vol. 72. No. 10. pag. 2162-2169;
- Bernardeau, M.; Vernoux, JP.; Henri-Dubernet, S.; Guéguen, M. 2007. The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology.* pp. 1-8;
- Bettencourt, F. s/d. União das Cooperativas Agrícolas de Lactícínios de São Jorge. Uniqueijo. <http://www.portais.ws/uniqueijo/>. Consultado em Abril de 2011;
- Biscaia, I.; Stadler, C.; & Pilatti, L. 2004. Avaliação das alterações físico-químicas em iogurte adicionado de culturas probióticas. XI SIMPEP – Bauru, SP, Brasil;
- Black, JG. 2002. *Microbiologia: fundamentos e perspectivas.* 4ª ed. Guanabara-Koogan, RJ;
- Botes, A.; Todorov, S. D.; Mollendorff, W.; Botha, A.; & Dicks, L. 2008. Identification of Lactic Acid Bacteria and Yeast from Boza. *Process Biochemistry.* Ref PRBI 8052;
- Breakwell, D. 2007. Colony Morphology Protocol. American Society for Microbiology, <http://archive.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2551>, consultado em Outubro de 2011;
- Breuer, B.; & Radler, F. 1996. Inducible resistance against nisin in *Lactobacillus casei*. *Arch. Microbiol.* 165: 114-118;
- Bruinenberg, P.G.; de Roo, G.; & Limsowtin, G.K.Y. 1997. Purification and characterization of cystathionine gamma-lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* SK11: Possible role in flavor compound formation during cheese maturation. *Appl Environ Microbiol.* 63: 561-566;

- Buncic, S.; Fitzgerald, S.; Bell, C.M.; & Hudson, R.G. 1995. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperatures. *Journal of Food Safety*. 15, 247–264;
- Caplice, E.; & Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149;
- Carr, F.J.; Hill, D.; & Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 281-370;
- CASFM (Comité de L'antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie). 2010. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Enterococcus* spp. pag. 36-37;
- Cerning, J.; Bouillanne, C.; Landon, M.; & Desmazeaud, Y. 1992. Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. *Journal Dairy Science*. 75: 692-699;
- Chai, W.L.; Haminah, H.; Cheng, S.C.; Sallam, A.A.; & Abdullah, M. 2007. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *Journal of Oral Science*. Vol 49. N°2.161-166;
- Chammas, G.; Saliba, R.; Corrieu, G.; Béal, C.2006. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk “laban”. *International Journal of Food Microbiology* 110: 52–61;
- Champomier-Verges, M.C.; Maguin, E.; Mistou, M.Y.; Anglabe, P.; & Chich, J.F. 2002. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *J Chromatogr. (in press)*;
- Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L.; & Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* 61, 1636–1643;
- Chaves, A.C.; Fernández, M.; Lerayer, A.L.; Mierau, I.; Kleerebezem, M.; & Hugenholtz, J. 2002. Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 68: 5656-5662;
- Christensen, J.E.; Dudley, E.G.; Pederson, J.A.; & Steele, J.L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 217-246;
- Citron, D. 2010. Susceptibility Testing for Fastidious Organisms: CLSI M45-A2 update. R.M. Alden Research Lab Culver City, CA;
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2001. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S21. pag. 84-86;
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2001. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S20. OXOID recommendation;
- Cogan, T.M.; & Accolas, J.P. 1990. Dairy Microbiology. *The Microbiology of Milk. Starter Cultures: Types, Metabolism and Bacteriophage* (eds R.K. Robinson). Second Edition. Volume 1. pp. 77. Elsevier Science Publishers LTD;
- Cogan, T.M.; Barbosa, M.; Beuvier, E.; Bianchi-Salvadori, B.; Cocconcelli, P.S.; Fernandez, I.; & Gomez, M.J.; Gomez, R. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J Dairy Res* 64, 409–421.
- Collado, M. C.; Grzeskowiak, L.; & Salminen, S. 2007. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr Microbiol.* 55:260-265;
- Coppola, R.; Succi, M, Tremonte, P.; Reale, A.; Salzano, G.; & Sorrentino E. 2005. Antibiotic susceptibility of *L. rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano Cheese. *Lait*, 85, 193-204;
- Coppola, R.; Succi, M.; Tremonte, P.; Reale, A., Salzano, G.; & Sorrentino, E. 2005 Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*. 85: 193-204;
- Corcionivoschi, N.; Drinceanu, D.; Mircea, I.; Stack, D.; Stef, L.; Julean, C.; & Bourke, B. 2010. The Effect of Probiotics on Animal Health. REVIEW. *Animal Science and Biotechnologies*. 43 (1);
- Corroler, D.; Mangin, I.; Desmasures, N., & Gueguen, M. 1998. An Ecological Study of Lactococci Isolated from Raw Milk in the Camembert Cheese Registered Designation of Origin Area. *Applied & Environmental Microbiology*. Copyright. Vol 16 N 12;
- Courvalin, P. 1994. Transfer of antibiotic resistance genes between gram - positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 38: 1447-1451;
- Crittenden, R.; Bird, A.R.; Gopal, P.; Henriksson, A.; Lee, Y.K.; & Playne, M.J. 2005. Probiotic research in Australia, New Zealand and the Asia-Pacific region. *Current Pharmaceutical Design*. 11: 37-53;

- Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P.; & Swain, C.H.A. 1973. *Microbiologia Médica. Crescimento e Nutrição das Bactérias*. 4ª edição. capítulo 3. 1:63-84;
- Cvitkovitch, D.G.; Guitierrez, J.A.; Behari, J.; Youngman, P.J.; Wetz, J.E.; Crowley, P.F.; Hillman, J.D.; Brady, L.J.; & Bleiweis, A. S. 2000. Tn917-lac mutagenesis of *Streptococcus mutans* to identify environmentally regulated genes. *FEMS Microbiol Lett*. 182: 149-154;
- Daba, H.; Lacroix, C.; Huang, J.; & Simard, R.E. 1993. Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 166-173;
- Danielsen, M.; & Wind, A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82: 1 - 11;
- Danielsen, M.; Simpson, P.J.; O'Connor, E.B.; Ross, R.P.; & Stanton, C. 2006. Susceptibility of *Pediococcus* spp. To antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03097.x;
- Davidson, P.M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: *Food Microbiology: Fundamental and Frontiers* (eds M.P. Doyle, L.R. Beauchat and T.J. Montville). ASM Press, Washington DC. pp. 56-520;
- De Martinis, E. C. P., & Freitas, F. Z. (2003). Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*, 14, 197–200;
- De Vuyst, L.; & Vandamme, E.J. 1994. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: Properties, biosynthesis, fermentation and applications. In *Bacteriocins of Lactic acid bacteria*. (Eds De Vuyst, L., Vandamme E.J.). Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall. London, Great Britain;
- De Vuyst, L.; Vanderveken, F.; Van de Ven, S.; & Degeest, B. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* 84:1059–1068;
- Detmers, F.J.M.; Kunji, E.R.S.; Lanfermeijer, F.C.; Poolman, B.; & Konings, W.N. 1998. Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochem.* 37: 16671-16679;
- Devirgiliis, C.; Coppola, D.; Barile, S.; Colonna, B.; & Perozzi, G. 2009. Characterization of the Tn916 conjugative transposon in a food-borne strain of *Lactobacillus paracasei*. *Appl Environ Microbiol.* 75: 3866-3871;
- Devriese, L., & Pot, B. 1995. The Genera Lactic Acid Bacteria: *The Genus Enterococcus*. (eds. Wood B. and Holzapfel W). Published by Blackie Academic and Professional. pp. 327-361;
- Dhillon, S.; Ghosh, M.; & Ganguli, A. 2007. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* Ch1 isolates from Indian green sausage. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 2: 105-110;
- Di Cagno, R.; De Angelis, M., Limitone, A.; Fox, P.F.; & Gobbetti, M. 2006. Response of *Lactobacillus helveticus* PR4 to heat stress during propagation in cheese whey with a gradient of decreasing temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 4503–4514;
- Dias, F.S. 1997. Uma breve reflexão sobre a História dos Açores com particular incidência no exemplo micaelense;
- Dicks, L. M. T., Mellett, F. D., & Hoffman, L. C. (2004). Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science*, 66, 703–708;
- DREPA (Direcção Regional dos Estudos e Planeamento dos Açores). 1985. São Jorge Caracterizado;
- Driehuis, F.; and Oude Elferink, S.J.W.H. 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Vet. Quart.* 22: 212-217;
- Drosinos, E. H.; Paramithiotis, S.; Kolovos, G., Tsikouras, I.; & Metaxopoulos, I. 2006. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece;
- El-Soda, M.; El-Wahab, H.A.; Ezzat, N.; Desmazeaud, M.J.; & Ismail, A. 1986. The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. II. Detection of esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, and *Lactobacillus acidophilus*. *Lait*. 66: 431-43;
- Emmons, D.B; Kalab, M.; Larmond, E.; & Lowrie, R.J. 1980. Milk gel structure. X. Texture and microstructure in Cheddar cheese made using whole homogenized low-fat milk. *J Tex Stud*. 11: 15-23;

- Ercolini, D.; Moschetti, G.; Blaiotta, G.; & Coppola, S. 2001. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Curr. Microbiol.* 42: 199-202;
- EUZÉBY, J.P. 2010. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/index.html>; Consultado em Julho de 2011.
- Fernández, M.; & Zúñiga, M. 2006. Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 32: 155-183;
- Fernández, M.; van Doesburg, W.; Rutten, G.A.; Marugg, J.D.; Alting, A.C.; van Kranenburg, R.; and Kuipers, O.P. 2000. Molecular and functional, analyses of the metC gene of *Lactococcus lactis*, encoding cystathionine beta-lyase. *Appl Environ Microbiol.* 66: 42-48;
- Ferreira, W.; & Sousa, J. 1998. Microbiologia. Diagnóstico Laboratorial em Microbiologia. LIDEL. Volume I. Capítulo 10: 207-220;
- Flores, A.B.; Delgado, S.; & Mayo, B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Can. J. Microbiol.* 51, 51-58;
- Fooks, L.J.; Fuller, R.; & Gibson, G.R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.* 9: 53-61;
- Forsythe, S.J. 2002. Microbiologia da Segurança Alimentar. A *Flora Microbiana dos Alimentos: Alimentos fermentados* (eds Tondo, E. C.). Artmed Editora. pp. 132-147;
- Fox, P.F. 1989. Proteolysis in cheese during manufacturing and ripening. *J Dairy Science.* 72: 1379-400;
- Franciosi, E.; Settanni, L.; Cavazza, A.; & Poznanski, E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal* 19: 3-11;
- Freni, K.; Tavará, F.; & Malcata, X. 2003. Enzymatic activities of non-starter lactic acid bacteria isolated from a traditional Portuguese cheese. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 236-243;
- Gala, E.; Landi, S.; Solieri, L.; Nocetti, M.; Pulvirenti, A.; & Giudici, P. 2008. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *International Journal of Food Microbiology.* 125: 347-351;
- Gaspar, F. 2005. Saudades da Terra, Livro VI, Ponta Delgada, Edt. Governo Regional dos Açores;
- Gelsomino, R.; Vancanneyt, M.; Condon, S.; Swings, J., & Cogan, T.M. 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int J Food Microbiol* 71, 177-188.
- Gibson, G. R.; & Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutr.* 125: 1401-1412;
- Gibson, G.R.; & Fuller, R. 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutr.* 130: 391S- 395S;
- Gobbetti, M. 1998. The sourdough microflora: interactions between lactic acid bacteria and yeast. *Trends Food Sci. Technol.* 9:267-274;
- Graham, J.P.; Price, L.B.; Evans, S.L.; Graczyk, T.K.; & Silbergeld, E.K. 2008. Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *Science of Total Environment* XX. Stoten-11054;
- Gruzza, M.; Langella, P.; Duval-Iflah, Y.; & Ducluzeau, R. 1993. Gene transfer from engineered *Lactococcus lactis* strains to *Enterococcus faecalis* in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Microb Releases.* 2: 121-125;
- Gutierrez, J.A.; Crowley, P.J.; Brown, D.P.; Hilman, J.D.; Youngman, P., & Bleiweis, A.S. 1996. Insertional mutagenesis and recovery of interrupted genes of *Streptococcus mutans* by using transposon Tn917: preliminary characterization of mutants displaying acid sensitivity and nutritional requirements. *J Bacteriol.* 178: 4166-4175;
- Haandrikman, A.J.; Meesters, R.; Laan, H.; Konings, W.N.; Kok, J.; & Venema, G. 1991. Processing of the lactococcal extra-cellular serine proteinase. *Appl Environ Microbiol*, 57: 1899-1904;
- Halami, P.M.; Chandrashekar, A.; & Nand, K. 2000. *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. *Letters Applied Microbiology*, 30, 197-202;
- Hammes, W.; & Vogel, R. 1995. The Genera Lactic Acid Bacteria: *The Genus Lactobacillus*. (eds. Wood B. and Holzapfel W). Published by Blackie Academic and Professional. pp. 19- 49;
- Hardie, J.; & Whitley, R. 1995. The Genera Lactic Acid Bacteria: *The Genus Streptococcus*. (eds. Wood B. and Holzapfel W). Published by Blackie Academic and Professional. pp 55-115;
- Harke, A.; Bouché, S.; Giard, J.C.; Benachour, A., Boutibonnes, P.; and Auffray, Y. 1996. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. *Curr Microbiol.* 33: 194-199;

- Harrigan, W. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology, Third Edition, Biochemical Tests for Identification of Microorganisms. California. Academic Press;
- Harrigan, W. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology. University of Reading, U.K.;
- Helinck, S.; Le, B.D.; Moreau, D.; & Yvon, M. 2004. Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Appl Environ Microbiol.* 70: 3855-3861;
- Heller, K.J. 2001. Probiotic bacteria in fermented food: product characteristics and starter organism. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 374S-379S;
- Herrero, M.; Mayo, B.; González, B.; & Suárez, J.E. 1996. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 565-570;
- Herreros, M., Sandoval, H., González, L.; Castro, J.; & Tornadizo, M. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology.* 22: 455-459;
- Holzappel, W.H.; Haberler, R.; Geisen, J.; Björkroth, U.; & Schillinger, P. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 365S-373S;
- Hoorde, K.; Verstraete, T.; Vandamme, P.; & Huys, G. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology.* 25: 929- 935;
- Igimi, S.; Ryu, C.H.; Park, S.H.; Sasaki, Y.; Sasaki, T.; & Kumagai, S. 1996. Transfer of conjugative plasmid pAM beta 1 from *Lactococcus lactis* to mouse intestinal bacteria. *Lett Appl Microbiol* 23: 31-35;
- Inês, A.; Tenreiro, T.; Tenreiro, R.; & Faia, M. 2008. As Bactérias do Ácido Láctico do Vinho. pp. 81-96;
- Jack, R.W.; Tagg, J.R.; & Ray, B. 1995. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microbiological Reviews* 59, 171-200,
- Jacobsen, L.; Wilcks, A.; Hammer, K.; Huys, G.; Gevers, D.; & Andersen, S.R. 2007. Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH 2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *FEMS Microbiol Ecol.* 59: 158-166,
- Jarvis, B. 1967. Resistance to nisin & production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* 47: 33-48;
- Jay, J.M. 2000. Fermentation and fermented dairy products, In *Modern Food Microbiology*, 6th edition. An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, USA. pp. 113-130;
- Jolly, L.; Vincent, S.J.F.; Duboc, P.; & Neeser, J.R. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 367-374;
- Kamaly, K.M.; & Marth, E.M. 1989. Enzyme activities of lactic streptococci and their role in maturation of cheese: a review. *J Dairy Science.* 72: 1945-66;
- Kandler, O.; & Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. (eds.: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., and Holt J.G.), *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore M.D., USA, pp. 1209-1234;
- Katla, A.K.; Kruse, H.; Johnsen, G.; & Herikstad, H. 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 147-152;
- Kieronczyk, A.; Skeie, S., Langsrud, T., & Yvon, M. 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and mostarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from aminoacids. *Appl Environ Microbiol.* 69: 734-739;
- Kim, W.S.; Perl, L.; Park, J.H.; Tandianus, J.E.; & Dunn, N.M. 2001. Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Curr Microbiol.* 43: 346-350;
- Kimmel, S.A., Roberts, R.F.; & Ziegler, G.H., 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined me'dium. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 659-664;
- King, N. 1948. Modification of Vogues-Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetyl methyl carbinol plus diacetyl in butter. *Dairy industries.* 13: 860-866;
- Klaenhammer, TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337-349;
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G.; Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G.; Hildebrandt, B.; Muller-Bertling, S.; Witte, W.; & Goossens, H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother* 59: 900-912;

- Kongo, J.M. 2009. Chemical, biochemical, microbiological and technological characterization of São Jorge cheese, and attempts to improve manufacture and ripening thereof. Tese de Doutorado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa;
- Kongo, J.M. 2010. São Jorge: O Queijo e a Ilha | 500 anos. Edição Universidade dos Açores. pp. 118-174;
- Kongo, J.M.; Ho, A.J.; Malcata, F.X.; & Wiedmann, M. 2007. Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072;
- Kunji, E.R.S.; Mierau, I.; Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W.N. 1996a. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 187-221;
- Kunji, E.R.S.; Mierau, I.; Poolman, B.; Konings, W.N.; Venema, G.; & Kok, J. 1996b. Fate peptides in peptidase mutants of *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol*. 21: 123-131;
- Lapuje, P.; Coccagn-Bousquet, M.; & Loubiere, P. 1998. Glutamate biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118. *Appl Environ Microbiol* 64: 2485-2489;
- Le Bars, D.; & Yvon, M. 2008. Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. *Journal Appl Microbiol*. 104:171-177;
- Leclercq, R.; Dutka-Malen, S.; Brisson-Noel, A.; Molinas, C.; Derlot E., Arthur, M.; Duval, J.; and Courvalin, P. 1992. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin Infect Dis* 15: 495-501;
- Lees, G.J.; & Jago, G.R., 1976. Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. *J. Dairy Res*. 43:75-83;
- Leisner, J.; Pot, B.; Christensen, H.m Olsen, G.; Wee, B., Muhamad, K.; & Ghazali, H.1999. Identification of Lactic Acid Bacteria from Chili Bo, a Malaysian Food Ingredient. *Applied and Environmental Microbiology*. pp. 599-605;
- Leroy, F., & De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (2). 67-78;
- Leroy, F.; & Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15: 67-78;
- Li Y, H.; Hanna, M.N.; Svensater, G.; Ellen, R.P.; & Cvitkovitch, D.G. 2001. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J Bacteriol*. 183: 6875-6884;
- Licht, T.R.; Struve, C.; Christensen, B.; Poulsen, R.L.; Molin, S., & Krogfelt, K.A. 2003. Evidence of increased spread and establishment of plasmid RP4 in the intestine under sub-inhibitory tetracycline concentrations. *FEMS Microbiol Ecol* 44: 217-223;
- Lima, C.; Lima, L., Cerqueira, M.; Ferreira, E.; & Rosa, C. 2009. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro Med. Vet. Zootec.*, v.61, 1: 266-272;
- Lindgren, S.E.; & Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food fermentations. *FEMS Microbiol. Rev*. 87: 3-149;
- Liu, J.R.; & Lin, C.W. 2000. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *J. Food Sci*. 65: 716-719;
- Liu, M.; Nauta, A.; Francke, C.; & Siezen, R.J. 2008. Comparative genomics of enzymes in flavour-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 74: 4590-4600;
- Liu, S.; Holland, R.; & Crow, V. 2003. The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination. *International Journal of Food Microbiology*. 86: 257- 269;
- Lorca, G.L.; & Valdez, G.F. 2001. A low-pH-inducible, stationary phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL639. *Curr Microbiol*. 42: 21-25;
- Lou, Y.; & Yousef, A. E. 1999. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. (eds. Ryser, E., and Marth, E.H.). *Listeria, listeriosis and food safety*. 2nd ed. New York: M. Dekker. chap. 6. p. 131-224;
- Lucas, P.M., Blancazo, V.S., Claisse, O.; Magni, C.; Lolkema, J.S.; & Lonvaud-Funel, A. 2007. Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. *Microbiology*. 153: 2221-2230;

- Manca de Nadra, M.C.; Pesce de Ruiz Holgado, A.A.; & Oliver, G. 1988. Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus buchneri*: a review. *Biochimie*. 70: 367– 374;
- Mariley, L., & Casey, M.G. 2004. Flavours os cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification os producing strains. *Inetrnational Journal of Food Microbiology*. 90. 139-159;
- Martín, M.; Sender, P.; Peiru, S.; de Mendoza, D.; & Magni, C. 2004. Acid-inducible transcription of the operon encoding the citrate lyase complexo *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis CRL264. *Journal Bacteriol* 186: 5649-5660;
- Martín, R. S.; Langa, C., Reviriego, E.; Jiménez, M.L.; Marín, J.; Xaus, L.; Fernández, J.; Rodríguez, M. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr*. 143: 754-758;
- Marty-Teyssset, C.; Lolkema, J.S.; Schmitt, P.; Divies, C.; & Konings, W.N. 1996. The citrate metabolic pathway in *Leuconostoc mesenteroides*: expression, amino acid synthesis, and a-ketocarboxylate transport. *J. Bacteriol*. 178: 6209– 6215;
- Mathur, S., & Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology* 105: 281– 295;
- Mayo, B.; Aleksandrak-Piekarczyk, T.; Fernández, M., Kwalczyk, M., Álvarez-Martín, P.; & Bardowski, J. 2010. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria*. (eds. Mozzi, F., Raya, R. and Vignolo G.). Wiley-Blackwell A John Wiley & Sons, Inc., Publication. pp. 3-33;
- Mazzotta, A.S.; & Montville, T.J. 1999. Characterization of fatty acid composition, spore germination and thermal resistance in a nisin-resisatnt mutant of *Clostridium botulinum* 169B and in the wild-type strain. *Appl. Environ. Microbiol*. 65: 659-664;
- McAuliffe, O.; Ross, R.P.; & Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev*. 25: 285-308;
- Mora, D.; Musacchio, F.; Fortina, M.G.; Senini, L.; & Manachini, P.L.2003. Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 561–570;
- Morelli, L.; Sarra, P.G.; & Bottazzi, V. 1988. In vivo transfer of pAM beta 1 from *Lactobacillus reuteri* to *Enterococcus faecalis*. *J Appl Bacteriol* 65: 371- 375;
- Moreno, F. M.R.; Sarantinopoulos, P.; Tsakalidou, E.; De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. A review. *Int. J. of Food Micro*. 106 1 – 24;
- Moreno, M.R.F.; Sarantinopoulos, P.; Tsakalidou, E.; & de Vuyst, L. (2006) The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 106, 1–24;
- Moulay, M., Aggad, H.; Benmechernene, Z.; Guessas, B.; Henni, D.E., & Kihal, M. 2006. Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their McaFaddin J. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. Catalase Test. 2º edição. 51-58; Proteolytic Activity. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, pp. 12-18;
- Musa, H., Wu, S.L., Zhu, C.H., Seri, H.I.; & Zhu, G.Q. 2009. The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8 (2): 313-321;
- Nes, I.F.; Diep, D.B., Havarstein, L.S. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Ant. Van Leeuw.*, 70:28-113;
- Nissen-Meyer, J.; Holo, H.; Håvarstein, L.S., Sletten, K., & Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bact*. 174: 5686-5692;
- Niven, C.F.; Smiley Jr., K. L.; & Sherman, J. M. 1941. The Hidrolysis of Arginine by Streptococci, pp. 651-659;
- O'Sullivan, L.; Ross, R.P.; & Hill, C.. 2002. Review: Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593-604;
- Ogawa, J.; Kishino, S.; Ando, A.; Sugimoto, S.; Mihara, K.; & Shimizu, S. 2005. Production of Conjugated Fatty Acids by Lactic Acid Bacteria: REVIEW. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 100. No. 4: 355–364;
- Olson ,NF. 1990. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiol. Rev* 87: 131-147;
- Orla-Jensen, S. 1919. In: Orla-Jensen, S. (Ed.), *The Lactic Acid Bacteria*. Høst, Copenhagen, pp. 1–196;
- Ouwehand, A., Salminen, S.; & Isolauri, E. 2002. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: *Probiotics: a overview of beneficial effects*. (eds. Siezen, R., Kok, J., Abee, T. e Schaafsma G.). Kluwer Academic Publishers. pp 279-289;

- Patarata, L. A. S. C. 2002. Caracterização e avaliação da aptidão tecnológica de bactérias do ácido láctico e *Micrococcaceae* em produtos de salsicharia. Tese de Doutorado. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro;
- Pederson, J.A., Mileski, G.J.; Weimer, B.C.; & Steele, J.L. 1999. Genetic characterization of a cell envelop-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal Bacteriol* 181: 4592-4597;
- Perreten, V.; Schwarz, F.; Cresta, L.; Boeglin, M., Dasen, G.; & Teuber, M. 1997. Antibiotic resistance spread in food. *Nature* 389: 801– 802;
- Pham, P.; Dupont, I.; Roy, D.; Lapoint, G.; & Cerning, J. 2000. Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and Analysis of Its Enzymatic Degradation during Prolonged Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, No. 6. 2302–2310;
- Pirttijärvi, T.S.M.; Andersson, M.A., Scoging, A.C.; Salkinoja-Salonen, M.S. 1999. Evaluation of methods for recognizing strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 133-144;
- Presser, K.A.; Ratkowsky, D.A., & Ross, T. 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl Environ Microbiol* 63: 2355-2360;
- Quivey Jr., R.G.; Kuhnert, W.L.; & Hahn, K.2000. Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv. Microb. Physiol.* 42: 239-274;
- Raha, A.R.; Ross, E.; Yusoff, K.; Manap, M.Y.; & Ideris, A. 2002. Characterisation and molecular cloning of an erythromycin resistance plasmid of *Lactococcus lactis* isolated from chicken cecum. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 6, 7–11;
- Rallu, F.; Cruss, A.; Ehrlich, S.D.; & Maguin, E. 2000. Acid and multistress resistent mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Mol Microbiol.* 35: 517-528;
- Rantala, M.; Lahti, E.; Kuhalampi, J.; Pesonen, S.; Järvinen, A-K.; Saijonmaa-Kouulumies, L.; and Honkanen-Buzalski, T. 2004. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in dogs given antibiotics for chronic dermatological disorders, compared with non-treated control dogs. *Acta vet. scand.* 45, 37-45;
- Reiter, B., & Sharpe, M.E. 1971. Relationship of the microflora to the flavor of Cheddar cheese. *J Appl Bacteriol* 34. 63-80;
- Rodríguez, E., Arqués, J.L.; Rodríguez, R., Nuñez, M.; & Medina, M.. 2003. Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 259-263;
- Salminen, S.; & Wright, A. 1998. *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*, 2ª edição, pp. 1-73;
- Salyers, A., Gupta, A.; & Wang, Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol* 12: 412-416;
- Salyers, A.; & Shoemaker, N.B. 1996. Resistance gene transfer in anaerobes: new insights, new problems. *Clin Infect Dis* 23 Suppl 1: S36-43;
- Sbordone, L.; & Bortolaia, C. 2003. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin. Oral Invest.* 7: 181-188;
- Scannel, A.G.M.; Hill, C.; Ross, R.P.; Marx, S.; Hartmeier, W.; and Arendt, E. K. 2000. Development of bioactive bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 241-249;
- Schierack, P., Filter, M., Scharek, L.; Toelke, C.; Taras, D.; Tedin, K.; Haverson, K.; Lubke-Becker, A.; & Wieler, L. H. 2009. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* on immune parameters of pregnant sows. *Vet Immunol Immunopathol.* 127:26-37;
- Schillinger, U., Geisen, R.; & Holzapfel, W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci Technol* 7:158-64;
- Schrezenmeir, J.; & de Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 361S-364S;
- Siezen, R.J. 1999. Multi-domain, cell-envelop proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 139-155;
- Silveira, J.C. 1927. *A Indústria dos Lactícínios nos Açores*, separata do *Boletim AGROS*. Lisboa;
- Simon, J.P.; & Stalon, V. 1982. Enzymes of agmatine degradation and the control of their synthesis in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 152: 676-681;

- Simpson, W.; & Taguchi, H. 1995. The Genera Lactic Acid Bacteria: *The Genus Pediococcus*. (eds. Wood B. and Holzapfel W). Published by Blackie Academic and Professional. pp.125-164;
- Simsek, O.; Ahmet, H. C.; & Tulumoglu, S. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough process. *Food Control*. 17: 263-270;
- Sneath, P.H.A.; & Holt, J.G.. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. A Waverly Company, Williams & Wilkins, Springer-Verlag, NY, USA. 2nd edition. VOL 1, pp. 64;
- Sobczak, I.; & Lolkema, J.S. 2005. The 2-hydroxycarboxylate transporter family: Physiology, structure, and mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 665-695;
- Soomro, A.H.; Masud, T.; & Anwaar, K. 2002. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1(1): 20-24;
- Sorum, H.; & Sunde M. 2001 Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*, 32,228-241;
- Stadhouders, J.; & Veringa H.A. 1973. Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. *Neth Milk Dairy J*. 27: 77-91;
- Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331–345;
- Stiles, M.E.; & Holzapfel, W.H. 1997. Review article: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol*. 36: 1-29;
- Stoffels, G., Nissen-Meyer, J.; Gudmundsdottir, A.; Sletten, K.; Holo, H.; & Nes, I.F. 1992. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol*. 58(5):1417-1422;
- Strompfova, V., Marcinakova, M., Simonova, M.; Gancarcikova, S.; Jonecova, Z.; Scirankova, L.; Koscova, J.; Buleca, V.; Cobanova, K., & Laukova, A. 2007. Enterococcus faecium EK13--an enterocin a-producing Bacillus cereus var. toyoi enhanced systemic immune response in piglets. *Vet Immunol Immunopathol*. pp. 118:1-11;
- Suzzi, G.; Caruso, M.; Gardini, F.; Lombardi, A.; Vannini, L.; Guerzoni, M.E., & Andrighetto, C. 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (Semicotto caprino). *J Appl Microbiol* 89, 267–274.
- Swaminathan, B. 2001. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; (eds. Montville, T. J.). *Food microbiology, fundamentals and frontiers*. 2nd ed. Washington D. C.: ASM. chap. 18. p. 383-409;
- Swenson, J.M.; Facklam, R.R.; & Thornsberrry, C. 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother*. 34, 543–549;
- Tankovic, J.;Leclercq, R.; & Duval, J. 1993. Antimicrobial susceptibility of *Pediococcus* spp. and genetic basis of macrolide resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020. *Antimicrob. Agents Chemother*. 37, 789–792;
- Tannock ,G.W. 1987. Conjugal transfer of plasmid pAM beta 1 in *Lactobacillus reuteri* and between lactobacilli and *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol* 53: 2693-2695;
- Tannock, G., Munro, K., Harmsen, H.J.M.; Welling, G.M.; Smart, J., & Gopal, P.K. 2000. Analysis of fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied Environmental Microbiology*. 66. 2578-2588;
- Temmerman, R.; Pot, B.; Huys, G.; & Swings, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol*. 81, 1–10;
- Teuber, M. 1995. The Genera Lactic Acid Bacteria: *The Genus Lactococcus*. (eds. Wood B. and Holzapfel W). Published by Blackie Academic and Professional. pp.173-230;
- Teuber, M.; Meile, L., & Schwartz, F., 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 76. 115– 137;
- Thapa, N., Pal, J., Tamang, J. 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas, *International Journal of Food Microbiology*. 107: 33-38;
- Thomas, L. V.; Clarkson, M. R., & Delves-Broughton, J. 2000. Nisin, p. 463-524. *In* Natural Viljoen B. 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*. 69: 37–44;
- Tynkkynen, S., Singh, K.V.; & Varmanen, P. 1998. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. *Int J Food Microbiol* 41: 195-204;

- Van de Guechte, M.; Serror, P.; Cherveaux, C.; Smokvina, T., Ehrlich, A.; & Maguin, E. 2002. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: *Stress responses in lactic acid bacteria*. (eds. Siezen R., Kok, J., Abee T., and Schaafsma G.). Kluwer Academic Publishers. pp 187- 216;
- Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K., & Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiology Reviews*, 60, 407–438;
- Viljoen, B. 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*. 69: 37–44;
- Vintov, J.; Aarestiup, F.M.; Zinn, S.E.; & Olsen, J.M. 2003. Association between phage types and antimicrobiol resistance among bovine *S. aureus* from 10 countries. *Veterinary Microbiology*. 95, 133-147;
- Wilkins, J.C.; Homer, K.A.; & Beighton, D. 2001. Aletred protein expression of *Streptococcus oralis* cultured at low pH revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*. 67: 3396-3405;
- Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. An Imprint of Chapman & Hall. 2: 19-269;
- World Gastroenterology Organisation. 2008. *Guías Prácticas de OMGE, Probiótico e Prebióticos*. Munich: WGO;
- Yvon, M.; & Rijnen, L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int Dairy Journal* 11:185-201;
- Zarazaga, M.; Sa'enz, Y.; Portillo, A.; Tenorio, C.; Ruiz-Larrea, F.; Del Campo, R.; Baquero, F.; & Torres, C. 1999. In vitro activities of ketolide HMR3647, macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*. 43, 3039–3041;
- Zendo, T.; Fukao, M.; Ueda, K.; Higuchi, T.; Nakayama, J.; & Sonomoto, K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 67: 1616-1619;
- Zhou, J.S.; Pillidge, C.J.; Gopal, P.K.; & Gill, H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol*. 98, 211–217;
- Zhou, J.S.; Pillidge, C.J.; Gopal, P.K.; & Gill, H.S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int J Food Microbiol* 98: 211-217.

Anexos

Anexo I

**Número de repicagens ao fim do qual os isolados
ainda não foram considerados puros.**

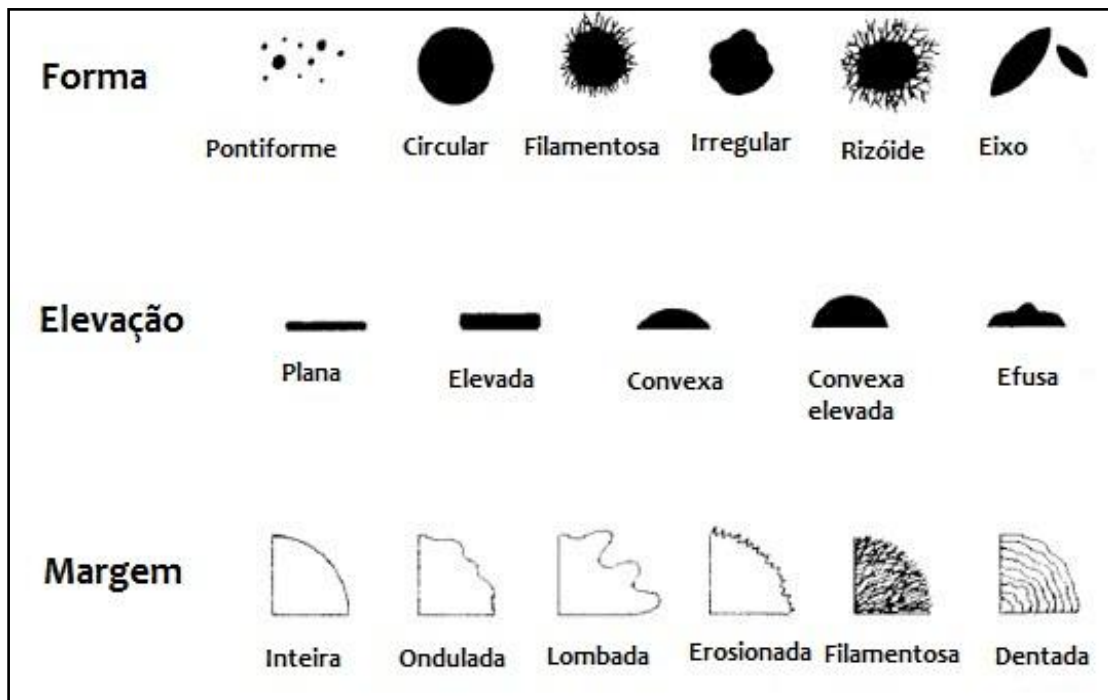
Quadro 1. Número de repicagens ao fim do qual os isolados ainda não foram considerados puros, para cada amostra.

Amostra	Total de Isolados	Nº de isolados	Nº da Repicagem
A	16	9	5 ^a
		2	6 ^a
		1	7 ^o
		1	9 ^a
		2	10 ^a
		1	15 ^a
B	9	5	5 ^a
		1	8 ^a
		1	9 ^a
		2	10 ^a
C	12	6	6 ^a
		1	7 ^a
		4	10 ^a
		1	13 ^a
F	3	3	12 ^a
G	2	2	13 ^a
H	2	2	10 ^a

Anexo II

**Diagrama ilustrativo de diferentes formas,
elevações e margens de colónias bacterianas.**

Figura 1. Diagrama ilustrativo de diferentes formas, elevações e margens de colónias bacterianas (Adaptado de Breakwell, 2007).



Anexo III

Resultados das Galerias API para as diferentes espécies.

Quadro 3. Resultados das galerias API para os isolados de *Pediococcus pentosaceus* e *Streptococcus thermophilus*.

Componentes activos	Isolados	
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Glicerol		
Eritrol		
D-arabinose		
L-arabinose		
D-ribose	■	
D-xilose		
L-xilose		
D-adonitol		
Metil-βD-xilopiranosido		
D-galactose	■	
D-glucose	■	■
D-fructose	■	
D-Manose	■	
L-sorbose		
L-ramnose		
Dulcitol		
Inositol		
D-Manitol		
D-sorbitol		
Metil-αD-manopiranosido		
Metil-αD-glucopiranosido		
N-acetilglucosamina	■	
Amigdalina	■	
Arbutina	■	
Esculina citrato de ferro	■	
Salicina	■	
D-celobiose	■	
D-maltose	■	
D-lactose		■
D-melibiose		
D-sacarose		■
D-trealose	■	
Inulina		
D-Melezitose		
D-rafinose		
Amido	■	
Glicogénio		
Xilitol		
Gentiobiiose	■	
D-turanose		
D-lixose		
D-tagatose		■
D-fucose		
L-fucose		
D-arabitol		
L-arabitol		
Gluconato de potássio		■
2-Cetogluconato de potássio		
5-Cetogluconato de potássio		

Legenda. O quadro foi preenchido de acordo com a seguinte designação:

Negativo Positivo Duvidoso

Quadro 4. Resultados das galerias API para os isolados da espécie *Enterococcus durans*.

Componentes activos	Isolados	
	<i>Enterococcus durans</i>	
Piruvato de sódio	■	
Ácido hipúrico	■	
Esculina citrato de ferro		
Ácido piroglutâmico- β-naftilamida	■	
6-bromo-2-naftil- αD-galactopiranosido		
Ácido naftol-ASBI-glicuronato		
2-naftil- βD-galactopiranosido		
2-naftil fosfato		
L-leucina- β-naftilamida	■	
L-arginina	■	
D-ribose	■	
D-arabinose		
D-manitol		
D-sorbitol		
D-lactose	■	
D-trealose	■	
Inulina		
D-rafinose		
Amido		
Glicogénio		

Legenda. O quadro foi preenchido de acordo com a seguinte designação:

Negativo Positivo Duvidoso

Anexo IV

Os isolados da espécie *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* com percentagem igual ou inferior a 96% de identificação no API.

Quadro 1. Os isolados da espécie *Lb. paracasei ssp. paracasei* com percentagem igual ou inferior a 96% de identificação no API.

Isolados	Código	% de Identificação	Testes complementares
			Crescimento a 45°C
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	12.1.7/D	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	9.8/B	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	29.9/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	27.9/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	29.2.9/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	25.2.7/D	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	6.2.7/D	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	20.1.4/A	89,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	17.9/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	16.1.7/D	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	17.2.8/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	14.8/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	42.8/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	29.2.8/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	42.8/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	17.8/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	42.3.8/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	2.1.8/D	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	40.6/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	28.6/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	6.1.7/D	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	12.2.7/D	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	31.8/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	2.2.3/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	12.1.7/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	31.2.10/C	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	6.2.7/D	95,6	+
<i>Lb. paracasei ssp paracasei 1</i>	27.1.6/C	95,6	+

Anexo V

**Curvas de Crescimento representativas de
algumas espécies de BAL isoladas.**

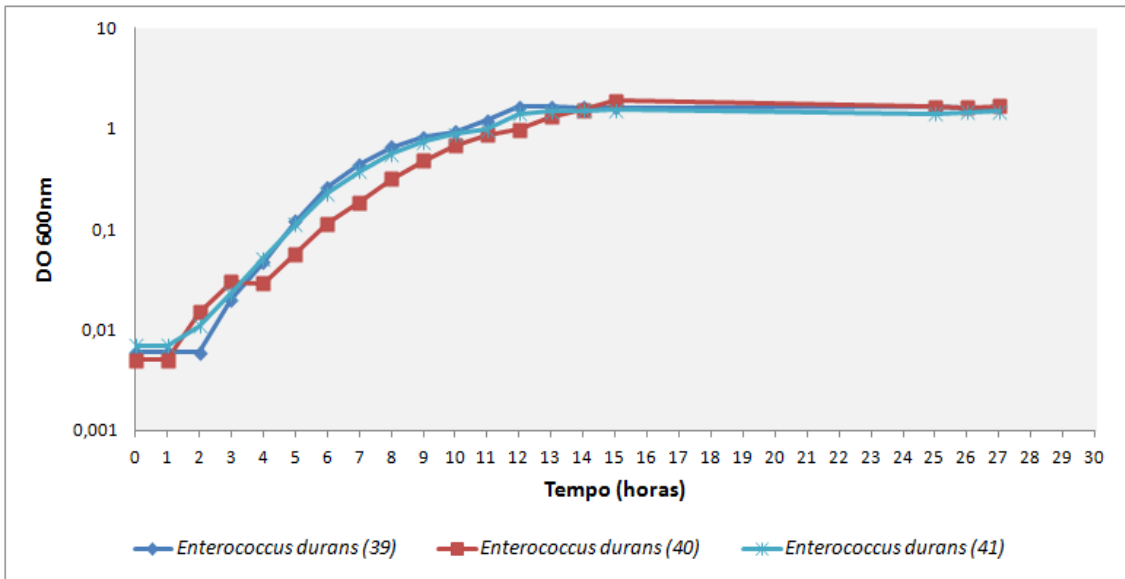


Figura 1. Curvas de crescimento dos 3 isolados da espécie *Enterococcus durans*.

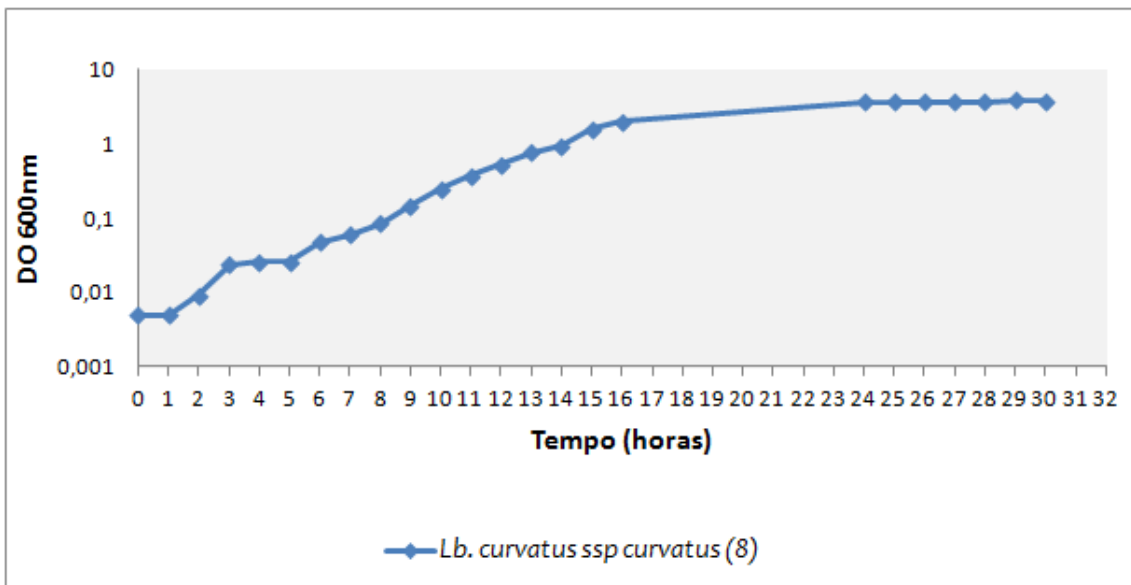


Figura 2. Curva de crescimento do isolado da espécie *Lb. curvatus ssp curvatus*.

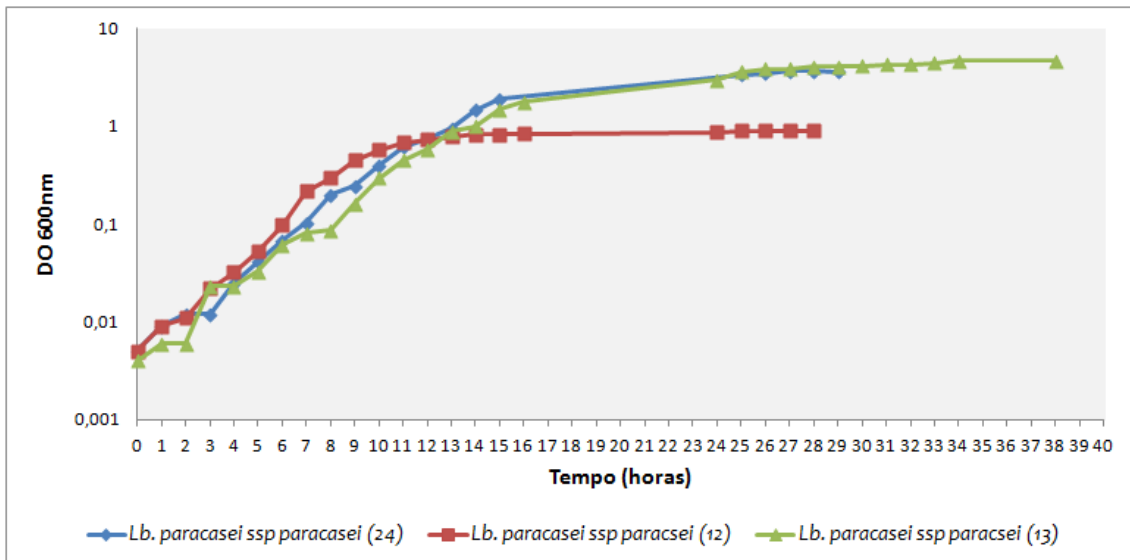


Figura 3. Curvas de crescimento de exemplos de isolados da espécie *Lb. paracasei ssp. paracasei*, (24) exemplo de um isolado que atingiu a fase estacionária às 24 horas, aproximadamente, (12) exemplo de um isolado que atingiu a fase estacionária às 15 horas, aproximadamente e, (13) exemplo de um isolado que atingiu a fase estacionária às 34 horas, aproximadamente.

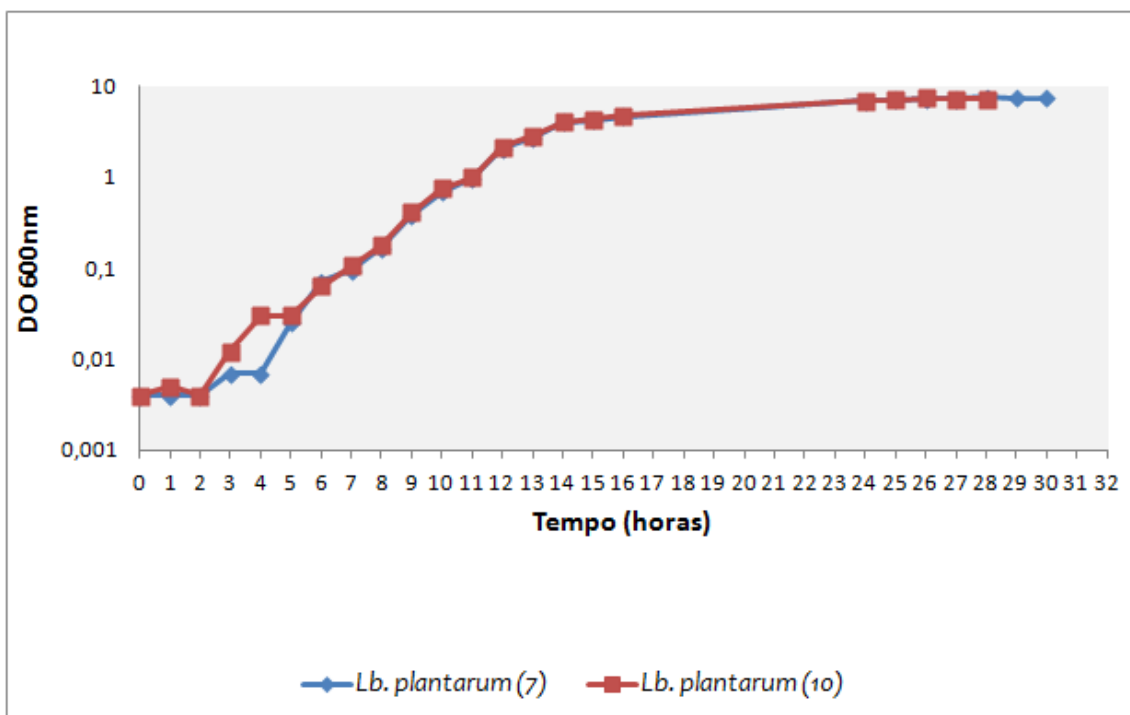


Figura 4. Curvas de crescimento dos isolados da espécie *Lb. plantarum*.

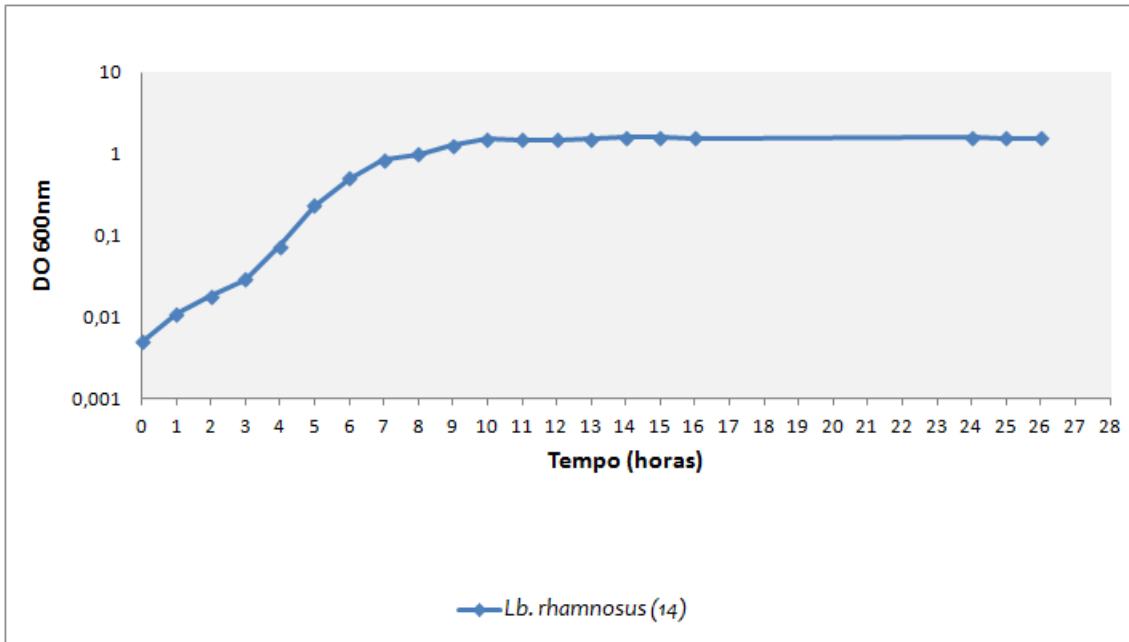


Figura 5. Curva de crescimento do isolado da espécie *Lb. rhamnosus*.

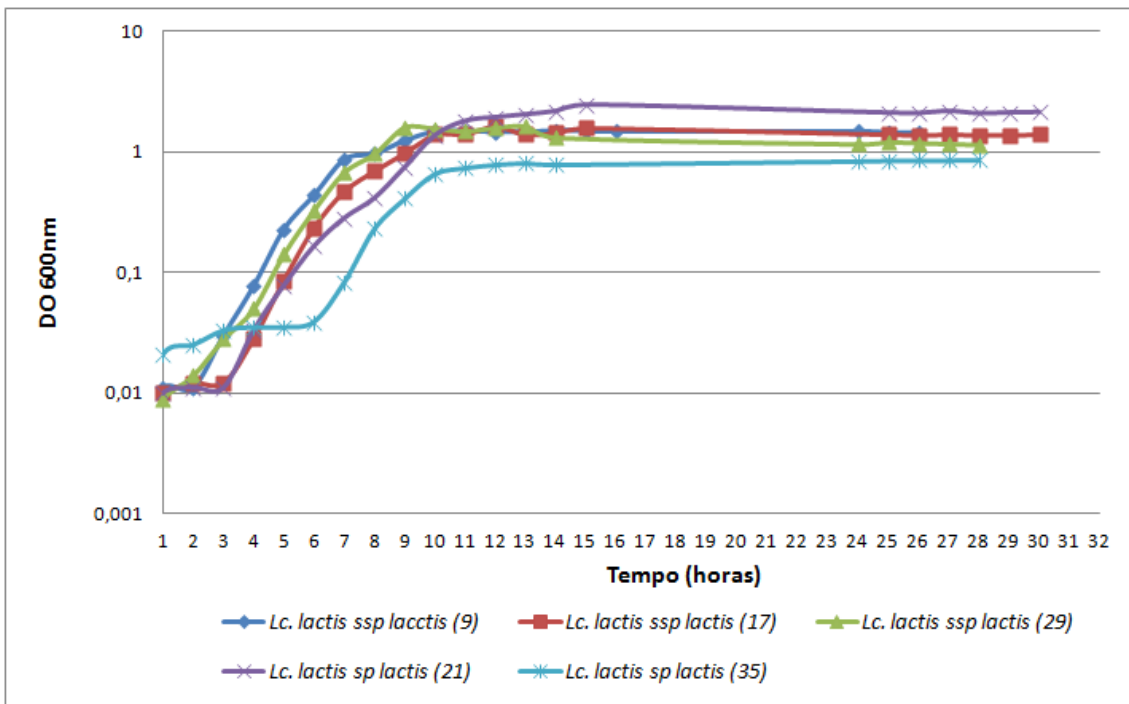


Figura 6. Curvas de crescimento de exemplos de isolados da espécie *Lc. lactis ssp. lactis*, (9) exemplo de um isolado que atingiu a fase estacionária às 11 horas, aproximadamente, (17) exemplo de um isolado que atingiu a fase estacionária às 12 horas, aproximadamente e, (29) exemplo de um isolado que atingiu a fase estacionária às 13 horas, aproximadamente, (21) exemplo de um isolado que atingiu a fase estacionária às 15 horas e, (35) exemplo de um isolado que atingiu a fase estacionária às 24 horas, aproximadamente.

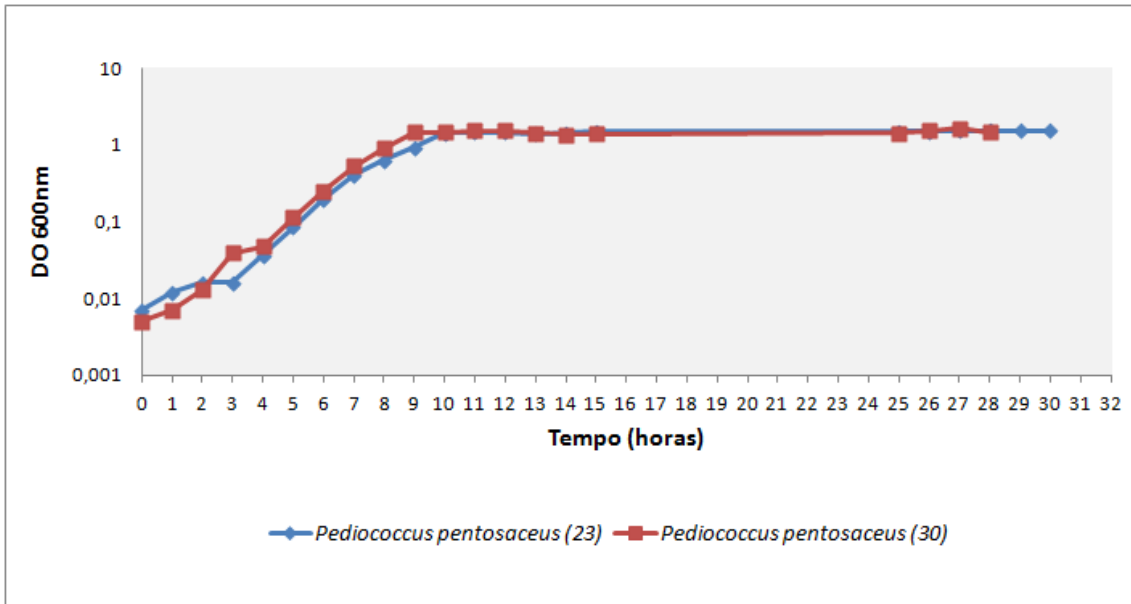


Figura 7. Curvas de crescimento dos isolados da espécie *Pediococcus pentosaceus*.

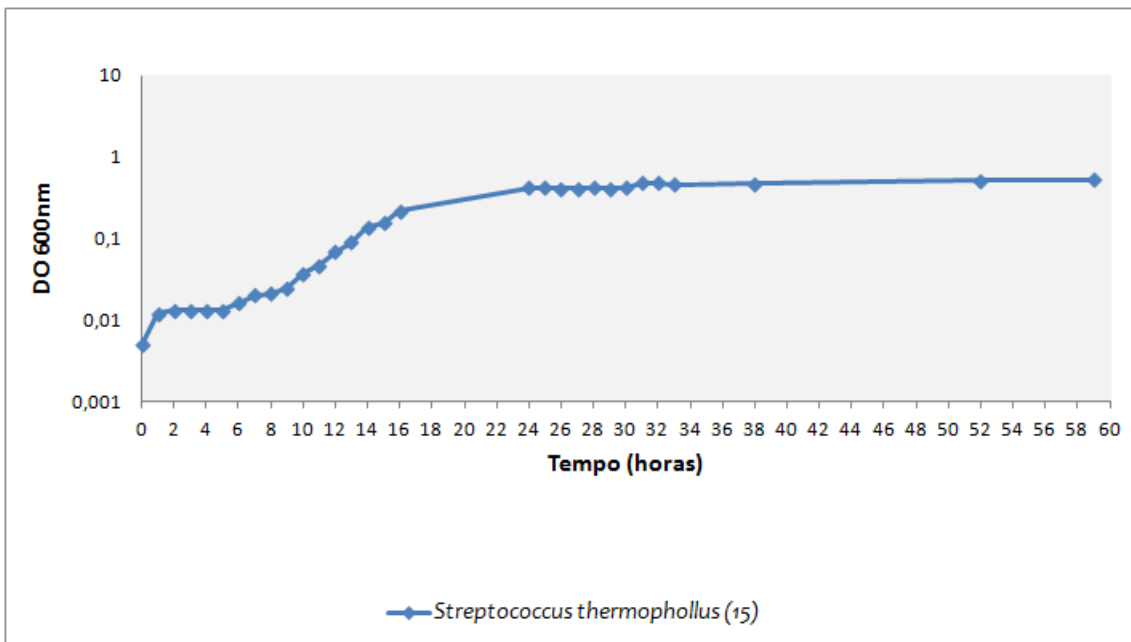


Figura 8. Curva de crescimento do isolado *Streptococcus thermophilus*.

Anexo VI

**Resultados da Produção de Diacetilo pelas
bactérias do ácido láctico.**

Quadro 1. Resultados da produção de diacetilo para o grupo de isolados lactobacilos. (Consoante a intensidade da cor do anel formado, os resultados foram classificados de fraco, médio e forte).

Isolado	Cód.	Resultados
<i>Lb. curvatus ssp. curvatus</i>	(8)	médio
<i>Lb. plantarum</i>	(7)	-
<i>Lb. plantarum</i>	(10)	-
<i>Lb. rhamnosus</i>	(14)	-
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(1)	fraco
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(3)	médio
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(4)	médio
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(5)	fraco
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 3</i>	(6)	fraco
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(12)	fraco
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(13)	forte
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(18)	fraco
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(24)	médio
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(26)	forte
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(28)	fraco
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(34)	médio
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei 1</i>	(38)	médio

Quadro 2. Resultados da produção de diacetil da espécie *Enterococcus durans*, *Pediococcus pentosaceus* e *Streptococcus thermophilus*. (Consoante a intensidade da cor do anel formado, os resultados foram classificados de fraco, médio e forte).

Isolado	Cód.	Resultados
<i>Enterococcus durans</i>	(39)	fraco
<i>Enterococcus durans</i>	(40)	-
<i>Enterococcus durans</i>	(41)	fraco
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	(23)	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	(30)	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	(15)	-

Quadro 3. Resultados da produção de diacetil para o grupo de isolados da espécie *Lc. lactis ssp. lactis*. (Consoante a intensidade da cor do anel formado, os resultados foram classificados de fraco, médio e forte).

Isolados	Cód.	Resultados
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(2)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(9)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(11)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(16)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(17)	fraco
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	(19)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	(20)	fraco
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	(21)	fraco
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	(22)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(25)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	(27)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(29)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(31)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	(32)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(33)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	(35)	médio
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(36)	-
<i>Lc. lactis ssp. lactis 1</i>	(37)	-