

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 morfologicamente 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>

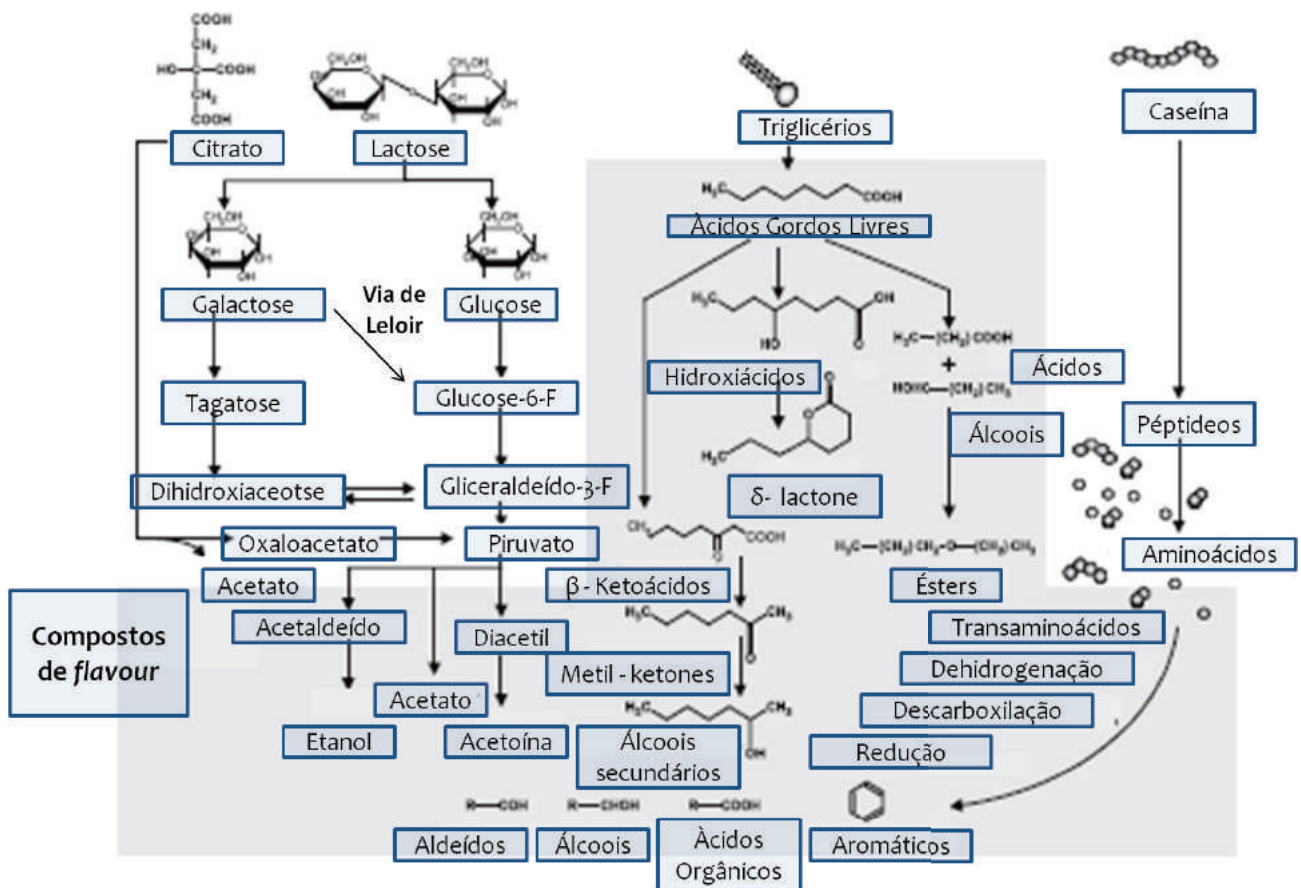


Figura 2.4. Produtos responsáveis pela formação de *flavours* no queijo: vias metabólicas (Adaptado de Mariley & Casey, 2004).

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).

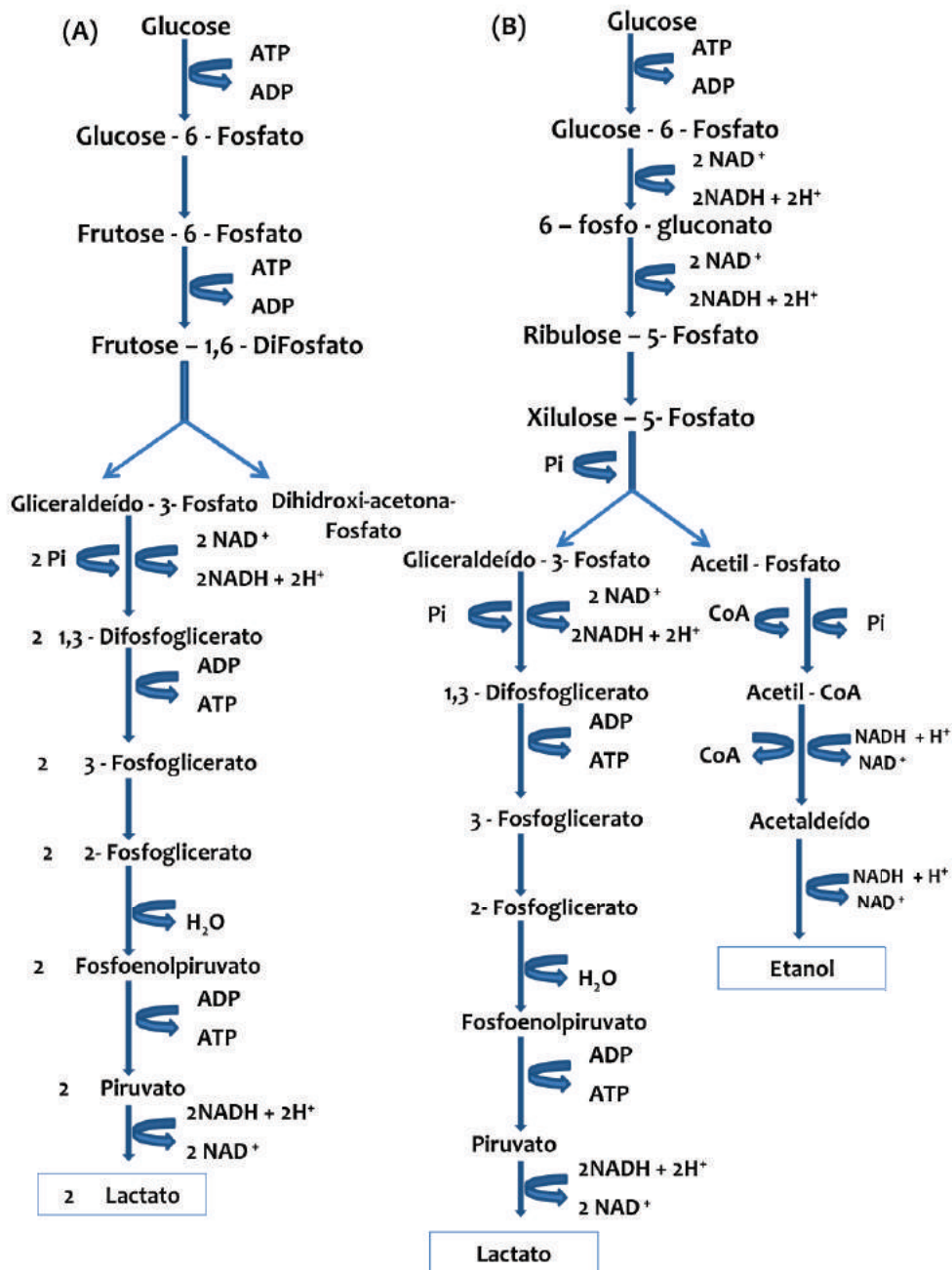


Figura 2.5. Vias de fermentação da glicose. (A) Via Homofermentativa; (B) Via Heterofermentativa (Adaptado de Salminen & Wrigth, 1998).

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).

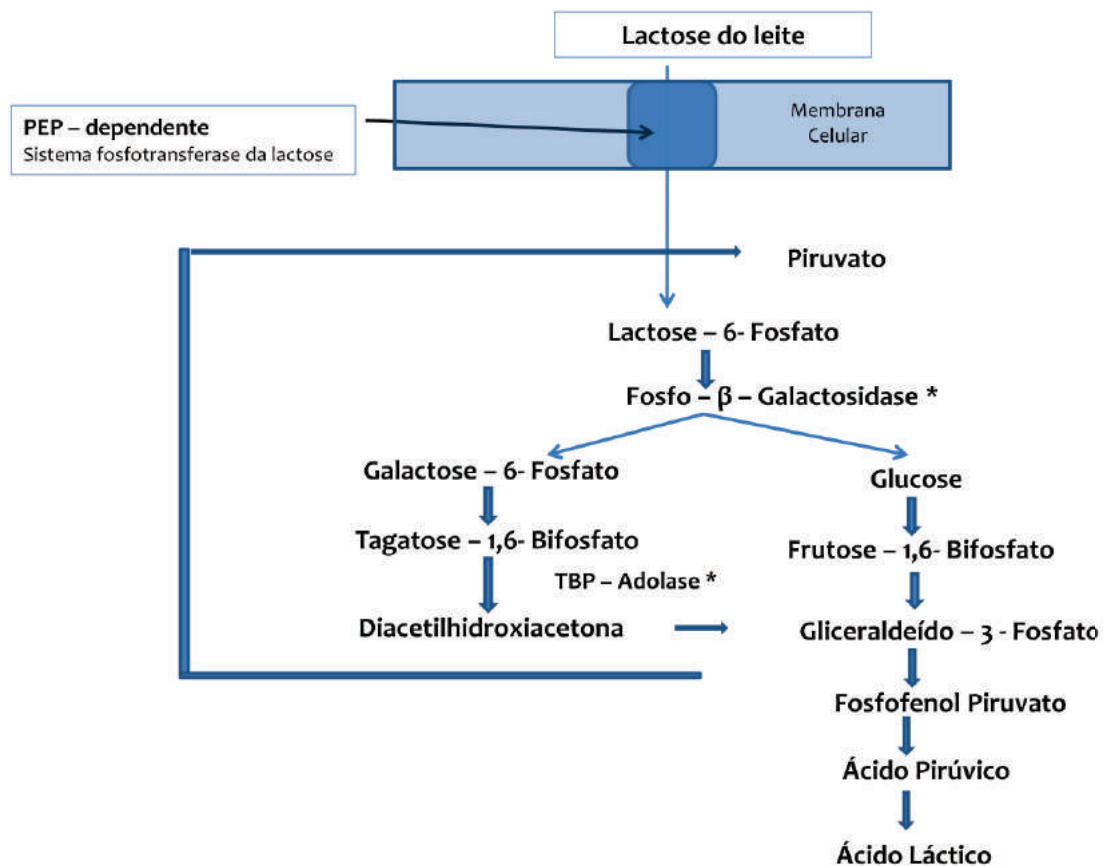


Figura 2.6. Metabolismo da lactose (Adaptado de Forsythe, 2002).

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).

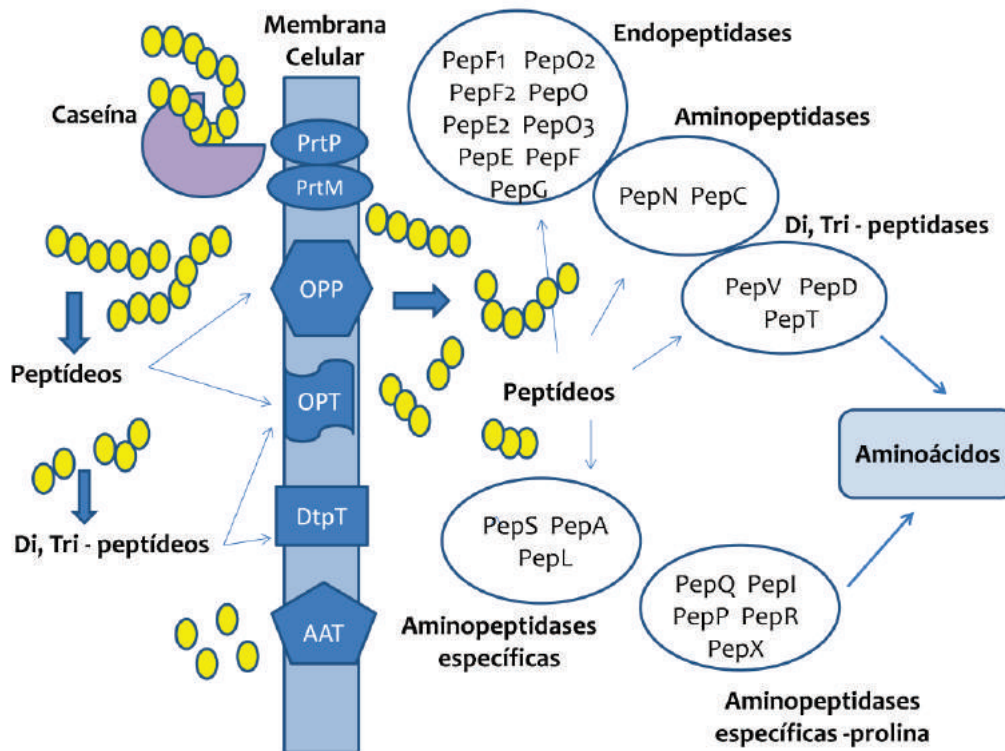


Figura 2.7. Metabolismo Proteolítico das bactérias do ácido láctico. O pentágono AAT refere-se aos diferentes tipos, cerca de 14, transportadores de aminoácidos. A acção e a especificidade das peptidases, mais o esquema dos péptídeos são indicadas por setas (Adaptado de Mayo et al., 2010).

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 oligopeptídeos 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 aminas 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).

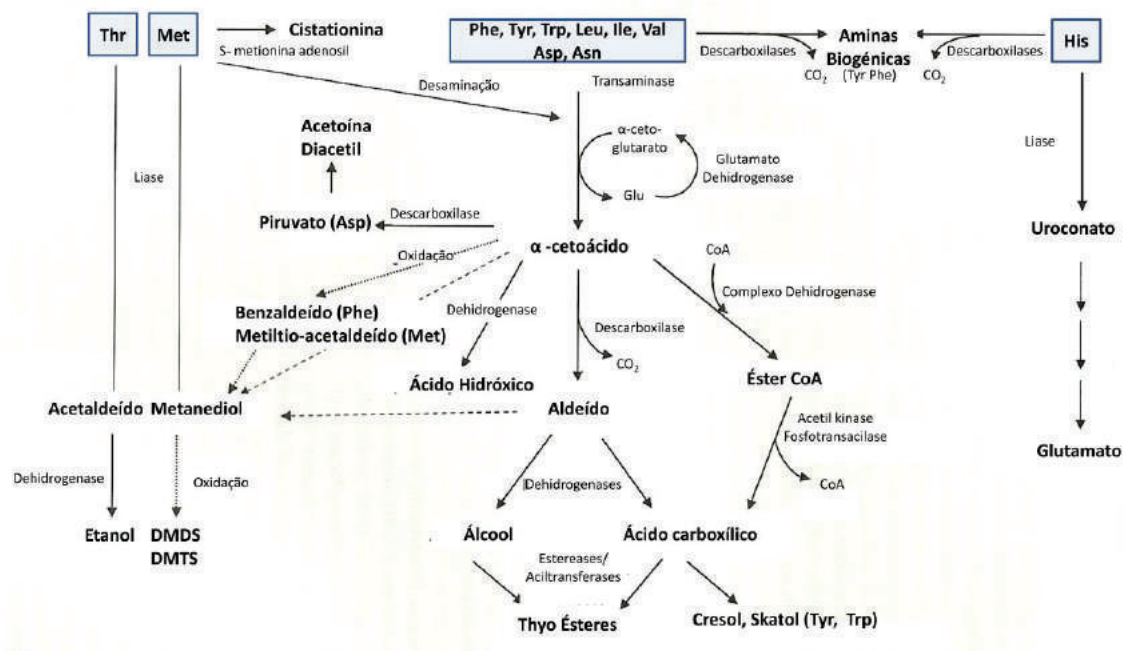


Figura 2.8. Vias Catabólicas dos principais aminoácidos envolvidos na produção dos compostos aromáticos. As linhas contínuas mostram as reacções enzimáticas catalisadas através das enzimas indicadas. As linhas pontilhadas e quebradas mostram as reacções químicas espontâneas e as vias mal definidas, respectivamente. 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 -cetogluturato, 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 deCO₂, 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).

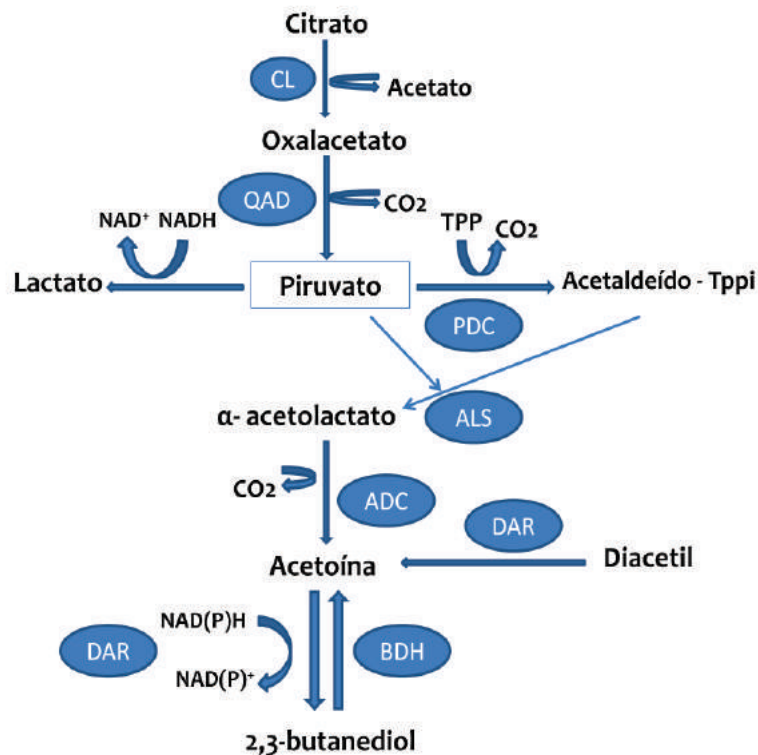


Figura 2.9. Metabolismo do Citrato em estirpes de *Lactococcus* e *Leuconostoc* (Adaptado de Mayo *et al.*, 2010).

Chave das enzimas: CL, citrato liase; OAD, 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 (Herrerros 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 intervirem 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 Carne de porco crua	<i>Lb. reuteli</i> G4 <i>Lb. reuteli</i> 100-63 <i>Lb. plantarum</i> caTC2R	Cat erm (T) 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 Queijo Grego Culturas starter de igourte	<i>Lc. lactis</i> estirpe K214 <i>Lb. acidophilus</i> ACA-DC-243 <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Str – tet – (S) cat Penicilina 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).

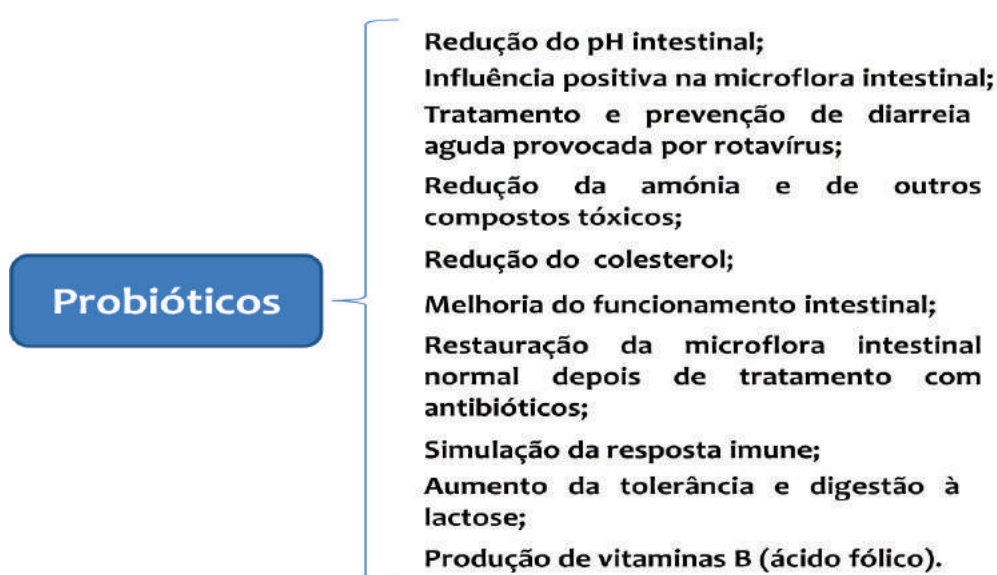


Figura 2.10. Benefícios do uso de probióticos para o hospedeiro (Adaptado de Prado *et al.*, 2008).

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.