

U. PORTO



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Avaliação da actividade proteolítica de bactérias
lácticas isoladas de queijo Serra da Estrela**

Zita Emanuela de Sá Veloso Martins

Orientada por: Prof. Doutora Ana Gomes

Co-orientada por: Mestre Hugo Guedes

Trabalho de Investigação

Porto, 2006

Dedicatória

Aos meus avós João, Carlos e Mimi que certamente ficariam felizes e orgulhosos por concluir a minha formação acadêmica...

Agradecimentos

- À minha sempre atenta orientadora, Dra. Ana Gomes, pela ajuda, disponibilidade, acompanhamento e orientação na realização e correcção deste trabalho;
- À Cláudia, pela disponibilidade, colaboração e cooperação na realização e correcção deste trabalho;
- Aos meus pais e avó pela dedicação, apoio, compreensão e paciência, essenciais para conseguir manter a minha integridade mental durante este período;
- Ao meu mano Vítor, pelo apoio, orientação e dicas;
- À Nancy pela ajuda e pela amizade;
- À Gila, à Manuela, ao Dias, ao Nuno, ao Secretário Fernando Viera e a todo o pessoal do Tribunal Administrativo e Fiscal de Braga, onde passei grande parte do tempo de redacção deste trabalho e que sempre foram capazes de me fazer rir...

... Obrigada!

Índice



Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Lista de Abreviaturas	vii
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras	xi
Resumo.....	xi
Palavras-Chave	xiii
1- Introdução.....	1
2 - Objectivos	18
3 - Material e Métodos	19
3.1 - Estirpes microbianas.....	19
3.2 - Avaliação da proteólise.....	19
3.3 - Avaliação de algumas vias metabólicas para a caracterização fenotípica das estirpes	21
3.3.1 - Fermentação da lactose	219
3.3.2 - Teste da β -galactosidase.....	22
3.3.3 - Teste fermentativo/oxidativo de açúcares.....	23
3.3.4 - Metabolismo do citrato.....	23
3.3.5 - Teste da urease	24
3.3.6 - Descarboxilação de aminoácidos	24
3.3.7- Teste da Phe/Trp desaminase.....	25
4 - Resultados.....	26
4.1 - Avaliação da proteólise.....	26

4.2 - Avaliação de algumas vias metabólicas para a caracterização fenotípica das estirpes	35
4.2.1 - Fermentação da lactose.....	35
4.2.2 - Teste da β -galactosidase	35
4.2.3 - Teste fermentativo/oxidativo de açúcares	36
4.2.4 - Metabolismo do citrato	38
4.2.5 - Teste da urease	39
4.2.6 - Descarboxilação de aminoácidos.....	40
4.2.7 - Teste da Phe/Trp desaminase	42
5- Discussão	42
6 - Conclusões	42
7 - Referências Bibliográficas.....	51
8- Índice de Anexos.....	65

Lista de Abreviaturas

Ala – Alanina

AraT – Aminotransferase dos aminoácidos aromáticos

Arg – Arginina

Asn – Asparagina

Asp – Aspartato

ATP – Adenosina trifosfato

BcaT – Aminotransferase dos aminoácidos de cadeia ramificada

Ca – Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CaCO₃ – Carbonato de cálcio

Cys – Cisteína

FAAI – Free Amino Acid Index

FeCl₃ – Cloreto de ferro

GABA – Ácido γ-aminobutírico

Gln – Glutamina

Glu – Glutamato

Gly – Glicina

HCl – Ácido clorídrico

His – Histidina

Ile – Isoleucina

Leu – Leucina

Lys – Lisina

K₂HPO₄ – Hidrogenofosfato de dipotássio

K₃PO₄ – Fosfato de potássio

Met – Metionina

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

MgSO₄.4H₂O – Sulfato de manganésio tetrahidratado

MgSO₄.7H₂O – Sulfato de magnésio heptahidratado

MRS – Mann, Rogosa, Sharp

NaCl – Cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – Diidrogenofosfato de sódio

Na₂HPO₄ – Hidrogenofosfato de sódio

ONP – Orto-nitrofenil

ONPG – Orto-nitrofenil-β-D-galatopiranosida

Opp – Sistema de transporte para oligopéptidos

PCA – Plate Count Agar

PCR – Reacção em cadeia da polimerase

Phe – Fenilalanina

PLP – Fosfato de piridoxal

PO₄ – Fosfato

Pro – Prolina

Prp – Serina proteinase extracelular ancorada à membrana

PTA-SN – Azoto solúvel em ácido fosfotungstico a 5 % (m/v)

RDI – Ripening Depth Index

REI – Ripening Extension Index

SCA – Simmons Citrate Agar

Ser – Serina

TCA – Ácido tricloroacético

TCA-SN – Azoto solúvel em ácido tricloroacético a 12 % (m/v)

Thr – Treonina

TN – Azoto total

TP – Proteína Total

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

Trp – Triptofano

Tyr – Tirosina

Val – Valina

WISE – Extracto insolúvel em água

WSE – Extracto solúvel em água

WSN – Azoto solúvel em água



Lista de Tabelas

Tabela 1. Avaliação da fermentação da lactose.....	35
Tabela 2. Avaliação da actividade da β -galactosidase.....	36
Tabela 3. Avaliação da oxidação de açúcares.....	38
Tabela 4. Avaliação da fermentação de açúcares.	38
Tabela 5. Avaliação da capacidade de metabolização do citrato.....	39
Tabela 6. Avaliação da actividade da urease.....	39
Tabela 7. Avaliação qualitativa da descarboxilação de aminoácidos.....	41
Tabela 8. Avaliação qualitativa da Phe desaminase e Trp desaminase.....	42



Lista de Figuras

Ilustração 1. Principais vias metabólicas para o catabolismo dos aminoácidos pelas bactérias lácticas	14
Ilustração 2. Evolução do REI.....	26
Ilustração 3. Evolução do RDI.....	27
Ilustração 4. Evolução do FAAI.....	28
Ilustração 5. Evolução dos valores médios dos índices para o controlo.....	29
Ilustração 6. Evolução dos valores médios dos índices para o <i>Lactobacillus brevis</i>	31
Ilustração 7. Evolução dos valores médios dos índices para o <i>Lactobacillus pentosus</i>	32
Ilustração 8. Evolução dos valores médios dos índices para a mistura.....	33
Ilustração 9. Electroforetogramas Ureia-PAGE.....	34

Resumo

O queijo Serra da Estrela é o produto tradicional português mais importante, apresentando características de textura e flavor únicas. A transformação da matéria-prima (leite de ovelha cru) no produto final (queijo) compreende um conjunto de alterações físico-químicas que condicionam as características finais do queijo. A proteólise ocorre por acção das enzimas existentes no leite, do coalho (*Cynara cardunculus*), e da flora microbiana, sendo fundamental não só para o próprio processo de fabrico como para o desenvolvimento do flavor. Com a crescente preocupação com as questões relacionadas com a segurança alimentar torna-se necessário encontrar uma alternativa ao processo tradicional de fabrico; a identificação de uma cultura de arranque composta por estirpes isoladas de queijo Serra da Estrela e com potencial tecnológico e bioquímico adequado permitirá ultrapassar o problema do fabrico com leite cru.

Assim, o presente trabalho englobou o estudo da caracterização bioquímica e actividade *in situ* de três estirpes isoladas do queijo Serra da Estrela. Foram preparados queijos modelo sem adição de inoculo, com adição de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus* ou com adição da mistura das duas estirpes, e ao longo do tempo de maturação foi avaliada a proteólise por determinação dos índices de extensão e profundidade de proteólise bem como do índice de aminoácidos livres. A electroforese de gel poliacrilamida (urea-PAGE) das amostras foi igualmente efectuada como metodologia auxiliar de avaliação da proteólise. A realização de testes identificativos do *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus pentosus*, acoplados à avaliação preliminar do metabolismo dos aminoácidos compuseram a caracterização bioquímica.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a utilização do *Lactobacillus pentosus* é mais vantajosa do que o *Lactobacillus brevis* e a associação das duas estirpes é desvantajosa. O *Lactococcus lactis* demonstrou possuir descarboxilase da His e da Arg; o *Lactobacillus brevis* e o *Lactobacillus pentosus* evidenciaram conter descarboxilase da His. É necessário realizar outros estudos que permitam complementar os dados obtidos, possibilitando uma avaliação mais exacta da exequibilidade da utilização destas estirpes numa potencial cultura de arranque.

Palavras-Chave:

Queijo Serra da Estrela; *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus brevis*; *Lactobacillus pentosus*; Actividade proteolítica; Fermentação; Metabolismo de aminoácidos.



1- Introdução

A produção de queijo é um dos métodos mais antigos e eficazes na conversão de alimentos facilmente perecíveis, mas com elevado valor nutricional (ex.: leite) em produtos com maior vida de prateleira (1, 2). É difícil estabelecer a origem exacta da produção de queijo, contudo acredita-se que foi desenvolvido no Crescente Fértil entre o rio Tigre e Eufrates há cerca de 8000 anos (1, 2).

O queijo pode ser definido como uma coalhada estabilizada de sólidos, resultante da coagulação da caseína, que encerra a maior parte da gordura do leite e parte da lactose, água, e proteínas do soro (albumina e globulinas), contendo também sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas (3-6). Durante a manipulação da coalhada, a maior parte da água e dos constituintes solúveis em água são separados e removidos sob a forma de soro (3, 5).

A qualidade final do queijo depende em grande parte da composição química do leite utilizado para a sua produção, existindo diferenças significativas entre o leite de vaca, ovelha, cabra e búfalo (leites que podem ser utilizados para a produção de queijo), a nível da composição do leite em lactose, proteína (cuja percentagem por peso varia entre 2.9% – cabra, e 4.8% – búfalo) e gordura (cuja percentagem por peso varia entre 3.7% – vaca, e 7.5% – búfalo). Essas diferenças influenciam o crescimento das culturas de arranque, as características físicas e o flavor do queijo (1, 7).

Apesar de existir um elevado número de variedades de queijos (estão registados aproximadamente 1000 variedades), o processo de fabrico da maioria envolve etapas comuns, que são básicas e necessárias para a produção de queijo, incluindo: coagulação do leite, dessoramento, moldagem e salga, e maturação (5, 7, 8). As diferenças dentro e entre variedades de queijos resultam

de modificações das etapas básicas, com conseqüente alteração das suas características, nomeadamente textura e flavor (5, 7, 8).

Em Portugal, o queijo Serra da Estrela, produto tradicional da Beira Alta, é o queijo de fabrico artesanal com maior importância, devido à sua tipicidade e qualidade ao nível da textura e flavor (9-12). Sabe-se que a sua origem data dos tempos da ocupação Romana da Península Ibérica. Os conhecimentos relativos ao processo de fabrico foram obtidos empiricamente e passados de geração em geração em famílias de pastores, mantendo as técnicas de fabrico praticamente inalteradas (9, 10). Foi o primeiro queijo tradicional de ovelha português com Região Demarcada (em 1985), tendo conquistado o estatuto de Denominação de Origem Protegida – DOP em 1994 (9, 13).

De uma forma geral, e de acordo com a legislação portuguesa, o queijo Serra da Estrela pode ser definido como: queijo de ovelha curado, de pasta semi-mole, amanteigada, branca ou ligeiramente amarelada, com poucos ou nenhuns “olhos”, obtido por dessoramento lento da coalhada, depois da coagulação do leite de ovelha cru e estreme pelo cardo (*Cynara cardunculus* var., L.), de fabrico artesanal e proveniente da Região Demarcada/ Área Geográfica de Produção “Serra da Estrela”(14, 15).

Assim, e mais detalhadamente, para que um queijo possua a denominação de queijo Serra da Estrela, são exigidas características que incluem: utilização de leite de ovelha proveniente das raças locais Bordadeira Serra da Estrela e Churra Mondegueira; dessoramento lento da coalhada; teor em humidade (isento de matéria gorda) entre 61 e 69 %; teor em gordura (extracto seco) entre 25 e 60 % (2, 9, 10, 12). O queijo deve ser em forma de cilindro baixo e regular, com diâmetro de 15 a 20 cm, 4 a 6 cm de altura e peso entre 1 e 1.7 kg; deve

apresentar também abaulamento lateral e ligeiro na face superior, sem bordos definidos e possuir uma consistência maleável, permitindo alguma flutuação (2, 9, 10). A crosta deve ser inteira, bem formada, fina e lisa, de aspecto amarelo-palha claro e uniforme (2, 9, 10). A pasta tem de ser fechada, com textura medianamente amanteigada e deformável, à percussão deve apresentar um som maciço ou ligeiramente timpânico, de aspecto untuoso, com nenhum ou poucos (e pequenos) “olhos” e cor branco-amarelada uniforme (2, 9, 10). É também essencial a existência de um aroma forte e de um flavor limpo, macio e ligeiramente ácido (9, 11). A nível nutricional e alimentar, o queijo Serra da Estrela poderá ser inserido no contexto de uma alimentação saudável considerando que, por um lado, possui características semelhantes aos restantes queijos no que diz respeito à alta digestibilidade, biodisponibilidade e alto valor biológico da proteína; aos níveis de cálcio, fósforo, vitamina A e D (16). Por outro lado, deve ser considerado o teor e perfil lipídico e os níveis de aminas biogénicas, razões suficientes para que a ingestão aconselhada seja a ocasional e não a frequente (16).

Apesar de ter sido sujeito a melhorias extensivas devido ao crescente controlo governamental, o queijo Serra da Estrela tem sido fabricado em condições muito fracas a nível higeossanitário, apresentando uma grande variação de composição bioquímica e microbiológica entre quintas, produtores e até mesmo dias de maturação (10). O manuseamento do leite; a coagulação; o corte e trabalho da coalhada, e dessoramento; a prensagem; a salga; e a maturação, são as principais etapas do processo de fabrico deste queijo (9, 10).

No processo tradicional, o leite proveniente da ordenha (efectuada manualmente duas vezes por dia) é transferido para contentores, que são

transportados para a zona de fabrico do queijo (dentro de casa), onde repousam 30 a 60 minutos em ambiente quente (9, 10). Ao contrário do que normalmente acontece na maioria dos queijos, o queijo Serra da Estrela não sofre um processo de standardização. Consequentemente, não é possível controlar a proporção de gordura-proteína do leite, nem o processo de coagulação por adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) ou por ajuste do pH para um nível desejado – pré-acidificação, que permite acelerar o processo ou diminuir a quantidade de coalho adicionado (1, 6, 7, 17). O processo que mais se aproxima à standardização resume-se a uma macrofiltração efectuada, em condições de higiene variáveis, com um pano limpo e fino, e que apenas permite a remoção de partículas de impureza (ex.:cabelo e pó). Após a filtração, o leite é despejado para a panela, que será utilizada como cuba de coagulação (9, 10).

A adição do coalho (cardo) ao leite pode ser feita por: adição directa da flor de cardo seca ao leite quente, seguida de agitação vigorosa e filtração do leite com um pano limpo e fino; maceração da flor de cardo seca com pequenas quantidades de água e sal até se formar uma pasta, que é dissolvida com mais água (de modo a facilitar a extracção das enzimas), filtrada com um pano limpo e fino e adicionada directamente no leite; ou por maceração da flor de cardo seca com água e sal, colocando a pasta formada dentro de um pano com pontas fechadas (boneca), que é submerso no leite, agitado e comprimido (10). A duração da coagulação (ca. 2 h) a uma temperatura constante de 30 °C é determinada empiricamente por avaliação visual da consistência do coágulo, observando o comportamento reológico com a agitação da cuba (10, 11).

A coagulação pode ser considerada como a etapa mais importante no fabrico de queijo (7). A formação da coalhada tem por base o comportamento da

solubilidade, a pH 4.6 e 20 °C, dos dois tipos de proteínas existentes no leite: as proteínas do soro, que se mantêm solúveis, e as caseínas, que precipitam (18). A caseína é constituída por α -caseínas (que englobam a α_{s1} -, α_{s2} -, κ -caseínas) e β -caseínas que representam cerca de 80 % do azoto total (TN) do leite (18, 19). A α_s -caseína é sensível ao cálcio (Ca) e a κ -caseína é insensível (18, 20). A formação de um gel mediante agregação e precipitação das caseínas ocorre por acção da cardosina A e da cardosina B, enzimas proteolíticas existentes no cardo e cuja qualidade constitui um dos factores da variabilidade do queijo Serra da Estrela (1, 6-9, 17, 21). Na primeira fase da coagulação enzimática, correspondente à proteólise em extensão (indicador da proteólise primária), a estrutura hidrofílica da κ -caseína é quebrada na ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆, originando glicomacropéptidos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) (resíduos 106-169) e para- κ -caseína hidrofóbica (resíduos 1-105) (7, 10, 18). A segunda fase, correspondente à proteólise em profundidade (indicador da proteólise secundária), é iniciada quando 85-90 % das ligações da κ -caseína estão quebradas (7). A fracção de κ -caseína que ainda se encontra intacta é incapaz de manter estáveis os restantes componentes do complexo de caseína (7, 18, 20). Adicionalmente, a para- κ -caseína, que continua ligada à α_s - e β -caseína, é altamente hidrofóbica e básica levando à destabilização, agregação e consequente precipitação da micela (6, 7). Apesar da indeterminação do mecanismo através do qual as proteínas se agregam, duas hipóteses são consideradas: 1) através da ligação hidrofóbica entre para- κ -caseínas, 2) através da ligação entre o Ca (existente no leite) e os resíduos de fosfato (PO₄) contidos nas α_s - e β -caseínas (7, 18). Simultaneamente à agregação de micelas de proteína, forma-se uma rede frouxa, que aprisiona os glóbulos de gordura, a água

e materiais solúveis em água (7, 20). A coagulação está dependente da concentração da caseína (a taxa de agregação é proporcional ao quadrado da concentração de caseína), do pH do leite (as cardosinas apresentam uma actividade proteolítica máxima com pH 5.1 - 6.0), da temperatura, da quantidade de cálcio existente no leite e da quantidade e concentração da actividade enzimática (3, 5, 7, 8, 20).

Após o corte manual da coalhada (10 a 15 segundos), os pedaços resultantes podem ser trabalhados e moldados por dois métodos com diferentes intensidades e duração (9-11). Assim, os pedaços podem ser colocados dentro de uma bolsa de pano e pressionados de modo a expelir o soro, ou colocados em moldes de metal flexível e perfurado com diâmetro ajustável (cincho), sendo a coalhada posteriormente cortada em pedaços mais pequenos e pressionados com ambas as mãos, de modo a libertar o máximo de soro possível (9-11).

O dessoramento é um processo pelo qual o líquido aprisionado (soro) é expulso do coágulo, tornando-o mais firme (3, 7, 17). A capacidade de remoção do soro determina a humidade (e conseqüentemente, a actividade microbiana e enzimática, que por sua vez afecta a maturação, estabilidade e qualidade do queijo) e a firmeza da coalhada, assim como a consistência do queijo (7, 8, 17). O processo de dessoramento é facilitado pelo corte do coágulo (efectuado anteriormente), que aumenta a área de superfície e reduz a distância para o processo de difusão (3, 7). O dessoramento é ainda auxiliado pela aplicação de pressão, efectuada com o auxílio de uma pedra de 6 a 20 kg colocada em cima do molde durante 3 a 24 h (3, 5, 7, 9-11, 17).

O processo de salga mais frequente consiste na adição de sal de cozinha não refinado ao leite, antes da adição do coalho, ou na adição de uma salmoura

concentrada contendo o extracto de cardo (7-10). A salga também pode ser externa (se realizada após a aplicação de pressão no queijo), friccionando ambas as superfícies com cristais de sal em períodos de tempo que variam entre 6 e 24 h (9-11).

A salga é uma etapa vital no fabrico de queijo porque, na sua ausência, o queijo praticamente não tem sabor (7). É também importante para a sua textura, flavor e qualidade microbiana (inibe o crescimento de certas bactérias, que são prejudiciais para o queijo), auxiliando a dissolução da caseína e a formação da casca, assim como a desaceleração da actividade enzimática (3, 7, 8). A concentração de sal no queijo Serra da Estrela varia entre 0.3 e 5.5 %. Dentro do bloco de queijo a concentração varia consideravelmente, devido à difusão lenta do sal (existe mais água e menos sal no centro, comparativamente com a superfície) (7, 10).

Na etapa seguinte, o queijo é transferido para uma sala de maturação (com uma temperatura mais baixa e humidade mais elevada do que na sala de produção, mas sem controlo artificial) onde é colocado numa prateleira de madeira cobertas com panos (9-11). Durante 8 a 15 dias o queijo é virado uma vez por dia, até aparecer uma mancha viscosa branca ou avermelhada (reima) nas superfícies expostas do queijo. Depois de ser lavado com água quente, é colocado um pano de algodão ou linho à volta do queijo, sendo posteriormente transportado para uma segunda sala de maturação (mais fria do que a primeira) durante mais 15 a 21 dias. Durante este período, o queijo é virado todos os dias e lavado uma vez por semana (9, 10). No decorrer da maturação (cuja duração total varia entre 30 e 45 dias, para o queijo Serra da Estrela fresco) as salas devem ter uma temperatura entre 6 e 12 °C e humidade relativa entre 85 e 90 % (9). A

composição química do produto no final da maturação é, em média: 40 % de água, 30 % de gordura, 20 % de caseína, 3% de lactose, 5 % de cinzas e 2.5 % de sal (10).

A maturação é responsável pelo desenvolvimento do flavor, textura e aparência únicas, mediante um conjunto de reacções físicas, microbianas e bioquímicas (3, 7, 8, 17). Como o fabrico do queijo Serra da Estrela é feito sem adição intencional de culturas de arranque, a microflora indígena do leite cru, constituída essencialmente por bactérias lácticas pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*, bactérias da família *Enterobacteriaceae*, bactérias do género *Staphylococcus* e leveduras, desempenha um papel de extrema importância no processo de maturação e no desenvolvimento das características sensoriais (10, 12, 22, 23).

Durante a maturação a proteína, gordura e lactose são hidrolisadas em diferentes extensões, através da combinação complexa da acção de enzimas provenientes do coalho (cardosina A e cardosina B), do próprio leite (plasmina) e da microflora indígena do leite (quer por acção dos próprios microrganismos, quer pelas enzimas libertadas depois da morte e lise celular) (3, 5, 7-10, 17, 24). A maturação é influenciada principalmente pela temperatura e humidade das salas de maturação, composição química da coalhada (conteúdo em gordura, proteína lactose, nível de aminoácidos, ácidos gordos e outros produtos resultantes da acção enzimática) e microflora indígena do leite. A humidade influencia a concentração dos solutos e a taxa de crescimento microbiano, que também é determinada pelo pH da coalhada, pela presença de substâncias inibitórias e pelo potencial de oxidação-redução (7, 9, 10, 17).

A proteólise é essencial não só para o desenvolvimento da textura, como para o desenvolvimento do flavor, abrangendo o conjunto de reacções mais complexo, comparativamente com a lipólise e glicólise (2, 25). O catabolismo das proteínas inclui a conversão das fracções da caseína em péptidos de cadeia longa (proteólise primária; iniciada na coagulação; as alterações na caseína podem ser detectadas por electroforese em gel de poliacrilamida), que são posteriormente degradadas em produtos de peso molecular mais baixo, nomeadamente péptidos e aminoácidos livres que são solúveis na fase aquosa do queijo (proteólise secundária; ocorre durante a maturação) (7, 26).

A proteólise da α_s - e β -caseína, por quebra de ligações vulneráveis dentro da cadeia polipeptídica, é provavelmente o processo mais importante e complexo da maturação, sendo essencial para o desenvolvimento do flavor e alterações no corpo e textura do queijo (7, 24, 25). Inclui uma cascata de reacções mediadas por acção da cardosina A e B, proteases naturalmente presentes no leite, e proteases e polipeptidases de bactérias indígenas (7, 9, 10, 24, 25).

Os péptidos derivados da caseína são degradados por peptidases, classificadas como endopeptidases e exopeptidases, de acordo com o local de clivagem. As endopeptidases quebram as ligações vulneráveis dentro da cadeia polipeptídica (7, 24). As exopeptidases hidrolisam os aminoácidos dos terminais amina e carboxil dos péptidos e são essenciais para a hidrólise extensiva da proteína e prevenção do sabor amargo, que resulta geralmente da proporção elevada de aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Phe e Pro) em péptidos constituídos por 3 a 27 resíduos de aminoácidos (7, 24, 25, 27).

Apesar das cardosinas desempenharem um papel mais proeminente na proteólise primária, apresentam também actividade peptidásica (principalmente a

cardosina B) quer como endopeptidases, assim como exopeptidases (9, 10, 12, 26). As cardosinas têm preferência por ligações peptídicas que contenham aminoácidos hidrofóbicos, como por exemplo na forma (Phe, Leu, Ile)-X, onde X é preferencialmente Val e Trp (10).

A plasmina (uma serina proteinase semelhante à tripsina) é a principal enzima proteolítica do leite e contribui para a proteólise primária (2, 24, 26, 27). A sua especificidade restringe-se às ligações peptídicas do tipo Lys-X e Arg-X (em menor extensão) (18, 27). A sua capacidade de degradação é superior na β -caseína (substrato mais importante) e na α_{s2} -caseína (muito susceptível à acção da plasmina). Possui menor influência na degradação da α_{s1} -caseína e exibe uma reduzida afinidade para a κ -caseína, que oferece uma elevada resistência à hidrólise (2, 18, 20, 24, 27). Subsiste uma hipótese que sugere que a acção hidrolítica da plasmina na α_{s2} -caseína resulta no seu desaparecimento, muitas vezes observado durante a maturação. Contudo, ainda não se conseguiu comprovar esta hipótese por incapacidade de identificação de péptidos derivados da α_{s2} -caseína (18, 27). A actividade da plasmina pode ser medida através da produção de γ -caseínas e azoto solúvel em água, a partir da β -caseína (2, 24).

Em relação ao papel desempenhado pelas bactérias indígenas durante a maturação, é de salientar a importância das bactérias lácticas, que constituem um grupo de cocos e bacilos Gram positivos, não formadores de esporos, anaeróbios aerotolerantes, nutricionalmente fastidiosos, estritamente fermentativos, tendo como produto final principal da fermentação de hidratos de carbono o ácido láctico, não possuem citocromos (catalase -), nem porfirinas (oxidase -) (4, 28-32). Os principais géneros pertencentes às bactérias lácticas são: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

Oenococcus, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (25, 28, 30, 31, 33).

Os sistemas proteolíticos das bactérias lácticas têm sido estudados extensivamente (24, 25). Enquanto que a sua actividade na proteólise primária é praticamente imperceptível, na proteólise secundária a sua actividade é fundamental (12). Apesar de não existirem estudos detalhados para todas as bactérias lácticas com actividade proteolítica, supõe-se que os seus sistemas proteolíticos sejam semelhantes ao que já é conhecido nos *Lactococcus* (cuja espécie mais estudada é o *Lactococcus lactis*) (28, 34). O sistema proteolítico dos *Lactococcus* é constituído por uma serina proteinase extracelular ancorada à membrana (Prt), que hidrolisa a caseína em péptidos, maioritariamente oligopéptidos com menos de 9 resíduos. Estes oligopéptidos, e péptidos de cadeia curta e aminoácidos presentes no meio são transportados para dentro da célula por sistemas de transporte específicos. Estes incluem sistemas de transporte para os aminoácidos, dois sistemas de transporte para di- e tripéptidos e um sistema de transporte para oligopéptidos (Opp) que aceita péptidos constituídos por 4 a 8 resíduos de aminoácidos (tendo sido demonstrado que também aceita oligopéptidos com, no máximo, 18 resíduos de aminoácidos) (1, 2, 4, 28, 34-36). Nos *Lactococcus*, apenas o sistema Opp possui um papel crucial na utilização de péptidos existentes no leite (36). Já no interior da célula, os péptidos são degradados em aminoácidos por um conjunto de peptidases intracelulares que possuem diferente especificidade, incluindo: endopeptidases, exopeptidases (aminopeptidases, iminopeptidases, pirolidonil carboxil peptidase, X-prolildipeptidil amino peptidase e carboxipeptidase), tripeptidase, dipeptidases, prolidase e prolinase (24, 27, 28, 31, 35, 37-39).

Com o decorrer da maturação verifica-se um aumento da morte e lise celular das bactérias, correlacionado com uma diminuição da sua viabilidade (mais acentuada nas últimas etapas da maturação) (26, 40, 41). A lise resulta da degradação enzimática do peptidoglicano da parede celular (essencial para a integridade da estrutura celular), por acção de hidrolases endógenas do peptidoglicano (autolisinas) (41). Nas bactérias lácticas (assim como em todas as bactérias Gram positivas), o peptidoglicano é um polímero constituído por resíduos de ácido *N*-acetil murâmico e *N*-acetil glucosamina, ligadas por cadeias pequenas de péptidos, formando uma forte rede tridimensional que rodeia a célula (41). Em situações de privação de nutrientes, a bactéria hidrolisa o peptidoglicano, provocando a lise e conseqüente libertação das enzimas intracelulares, permitindo que estas alcancem os substratos presentes na matriz do queijo, contribuindo para a proteólise, diminuindo o amargo (por hidrólise péptidos hidrofóbicos derivados da caseína) e aumentando o nível de aminoácidos livres (1, 7, 24, 25, 27, 35, 41, 42).

Os aminoácidos formados (assim como outros produtos resultantes da proteólise) encontram-se na fracção não volátil, solúvel em água (24, 26). Além de contribuírem para o flavor do queijo *per se* e como precursores para a formação de outros compostos voláteis do flavor e aroma importantes, os aminoácidos são utilizados pelas bactérias para a síntese de proteínas, como fonte energética, para regular o pH interno, para regenerar co-substratos e para biossíntese (24, 31, 43, 44). No queijo, o catabolismo dos aminoácidos por degradação enzimática depende da sua utilização, iniciando-se geralmente com uma transaminação ou lise, podendo também ser iniciada por uma descarboxilação ou desaminação. As

enzimas responsáveis pelo catabolismo existem a nível intracelular e incluem desaminases, descarboxilases, transaminases e liases (7, 24, 25, 27, 34, 43).

Nas bactérias lácticas, a formação do flavor está dependente da actividade das enzimas presentes e expressas nas bactérias, e da combinação das estirpes existentes no queijo, resultando principalmente do catabolismo dos aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada, e da metionina (34, 45). A actividade enzimática responsável pelo catabolismo pode ocorrer quer a nível intracelular, quer na matriz do queijo (após a lise celular) (7, 24, 25, 31, 34, 46).

A via metabólica mais importante para o catabolismo dos aminoácidos pelas bactérias lácticas (Ilustração 1) tem início com a remoção do grupo amina, transferido para o α -cetoácido aceitador, por acção de aminotransferases, que incluem as aminotransferases dos aminoácidos aromáticos (AraT) e as aminotransferases dos aminoácidos de cadeia ramificada (BcaT) (31, 43, 44, 47-50). Segundo um estudo realizado por Rijen *et al.* (51) as Ara T e BcaT são essenciais para a produção da maioria dos compostos do aroma a partir dos aminoácidos. As AraT são activas nos aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp), Leu e Met, e as BcaT são activas nos aminoácidos de cadeia ramificada (Leu, Ile, Val) e na Met (47). São as únicas enzimas capazes de iniciar a conversão de aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada em compostos do aroma (51). Foi demonstrado que as aminotransferases das estirpes de *Lactococcus* e *Lactobacillus* são enzimas dependentes de fosfato de piridoxal (PLP) que utilizam o α -cetoglutarato como aceitador do grupo amina, com a consequente produção de Glu (43, 47). A transaminação resulta na produção de um α -cetoácido correspondente e específico para cada aminoácido (43, 47). Apesar da importância da transaminação, a quantidade e variabilidade de compostos do

aroma produzidos são determinados pelas reacções que ocorrem posteriormente (52). Assim, os α -cetoácidos podem ser transformados, por descarboxilação, em aldeídos, que podem ser convertidos em álcoois, por redução ou em ácidos carboxílicos, por oxidação (Ilustração 1) (34, 40, 47, 49). Os ácidos carboxílicos podem ser formados, alternativamente, por descarboxilação oxidativa do α -cetoácido (Ilustração 1) (49, 53). Para além dos compostos já mencionados, os α -cetoácidos podem originar hidroxíácidos (que não são compostos do aroma importantes), por acção de 2-hidroxiácido desidrogenases, e compostos sulfurados (Ilustração 1) (27, 34, 47, 48).

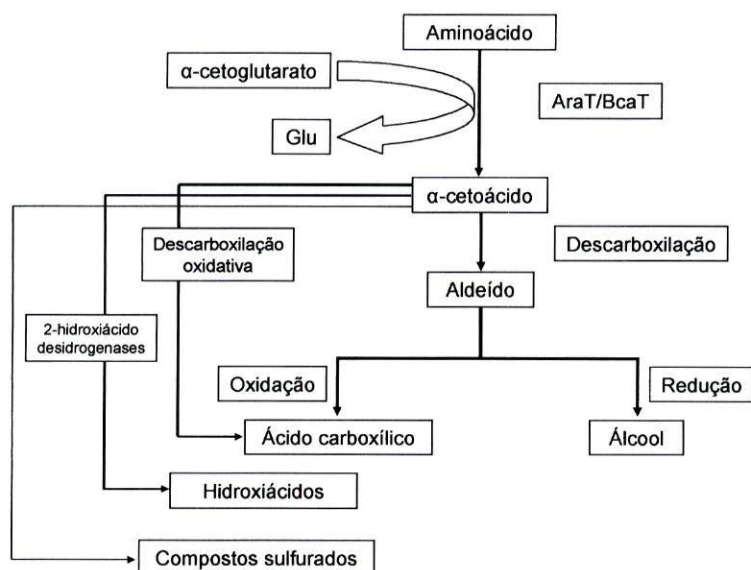


Ilustração 1. Principais vias metabólicas para o catabolismo dos aminoácidos pelas bactérias lácticas.

Os aldeídos resultantes da transaminação dos aminoácidos de cadeia ramificada (3-metilbutanal, 2-metilbutanal e 2-metilpropanal) são caracterizados por um flavor a malte; os álcoois (3-metilbutanol, 2-metilbutanol e 2-metilpropanol) podem apresentar um flavor a fruta e a álcool; os ácidos gordos de cadeia

ramificada (ácido 3-metilbutanóico, ácido 2-metilbutanóico e ácido 2-metilpropanóico) são responsáveis pelo flavor a suado e também a ácido, ranço, podre, fruta e amanteigado (contudo, o seu processo de formação não é habitual nas bactérias lácticas) (31, 43, 50, 51, 53, 54).

Do catabolismo dos aminoácidos aromáticos resultam compostos que contribuem não só para o desenvolvimento de flavor a rosa (fenilacetaldeído, feniletanol), a flores (fenilacetaldeído, feniletanol), a mel (fenilacetaldeído, ácido fenilacético) e a amêndoa amarga (benzaldeído), assim como flavor a químicos, pútridos e fecais (indol e escatol) (43, 50, 51, 53, 55).

A transaminação da Met (aminoácido que contém enxofre) origina, 4-metil-tio-2-cetobutirato, que é descarboxilado em metional. Por sua vez, o metional é transformado em metanol (flavor a batata cozida), por redução, ou em ácido 3-metiltiopropiónico (flavor *cheesy*), por oxidação (31, 40, 43, 47, 53, 56, 57). Nos *Lactococcus* e *Lactobacillus*, a conversão da Met pode também envolver reacções de eliminação, por acção de uma cistationina β -liase e cistationina γ -liase (dependentes de PLP), com formação de dimetildissulfido, dimetiltrissulfido, α -cetobutirato e amónia (52, 53). Para além do flavor a batata cozida e *cheesy*, o metabolismo da Met pode originar flavor a couve cozida, a carne, a alho e a ovo (43, 47, 51).

Tavaria *et al.* (58) verificaram que, apesar de os aminoácidos mais abundantes no queijo Serra da Estrela com 180 dias de maturação serem a Leu, Val, Glu e Lys, os produtos voláteis encontrados no queijo são derivados do catabolismo da Ala (etanol, ácido propiónico), Glu (1-propanol), Gly (ácido acético), Asp (butil lactato), Leu (3-metilbutanol, ácido 3-metilbutírico, ácido 4-metilvalérico), Lys (ácido hexanóico), Phe (feniletanol, ácido fenilacético), Tyr

(fenol) e Val (isopropil isobutirato, ácido 2-metilpropiónico). O composto volátil mais abundante no queijo Serra da Estrela é o ácido 3-metilbutírico (58). Contudo, nem todos os compostos voláteis possuem propriedades odor-activas que possibilitam uma contribuição para a formação do flavor (47). No mesmo estudo, como tentativa de padronização, foi analisada a formação de compostos voláteis num queijo modelo com 7 dias de incubação, inoculado com bactérias lácticas pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Enterococcus* (previamente isolados do queijo Serra da Estrela). Os resultados demonstraram que as estirpes pertencentes ao género *Lactobacillus* tinham a capacidade de produzir: 2-metilbutanol (Ile), 3-metilbutanol (Leu), dimetiltrissulfido (Met), benzaldeído (Phe), indol piruvato (Trp), fenol (Tyr) e ácido 2-metilpropanóico (Val). As estirpes pertencentes ao género *Lactococcus* produziram: ácido 3-metilbutírico (Leu), benzaldeído (Phe), fenol (Tyr), 2-metilpropanol e ácido 2-metilpropanóico (Val) (58).

Como já foi referido, o catabolismo dos aminoácidos pelas bactérias lácticas pode também ter início com reacções de descarboxilação, que possibilitam a regulação do pH interno das bactérias, que se encontram num meio ácido, através da produção de ácido γ -aminobutírico (GABA) a partir do Glu, por acção da glutamato descarboxilase. A sua actividade é conhecida no *Lactobacillus brevis*, sendo raramente encontrada em estirpes de *Lactococcus lactis* (43, 59, 60). Apesar do impacto do GABA no flavor não ser conhecido, pensa-se que poderá contribuir para a diminuição do flavor azedo e umami, associado ao Glu (43, 59). A descarboxilação dos aminoácidos pode também resultar na formação de aminas biogénicas, cujo conteúdo nos queijos aumenta durante o período de maturação (43, 59, 61). Estas podem ser definidas como compostos azotados

básicos com baixo peso molecular formados principalmente por descarboxilação de aminoácidos (sendo a actividade da maioria destas enzimas dependente de PLP), podendo também resultar da aminação e transaminação de aldeídos e cetonas, com conseqüente substituição de um, dois ou três átomos de hidrogénio da amónia por grupos alquil ou aril (34, 59, 62-64). As aminas biogénicas podem ser classificadas de acordo com as características químicas, como: aminas aromáticas (tiramina, β -feniletilamina), aminas heterocíclicas (histamina e triptamina) e diaminas, triaminas e poliaminas alifáticas (putrescina, cadaverina, agmatina, espermina e espermidina) (62, 63).

Os precursores da tiramina, β -feniletilamina, histamina, triptamina, putrescina, cadaverina, agmatina, espermina e espermidina são, respectivamente, a Tyr, a Phe, a His, o Trp, a ornitina (que pode resultar da degradação da Arg), da Lys e da Arg (46, 62-64).

O queijo representa um ambiente ideal para a formação de aminas biogénicas, que está directamente dependente da densidade e actividade bacteriana, sinergismos entre microrganismos, nível de proteólise (disponibilidade de substrato), pH, concentração de sal e, indirectamente, da temperatura e tempo de maturação e armazenamento e da actividade da água (34, 46, 61-66). Contudo, a concentração de aminas biogénicas no queijo só poderá atingir níveis perigosos se mais do que um destes factores forem favoráveis (65). As principais aminas biogénicas envolvidas na intoxicação alimentar são a histamina, a tiramina, a triptamina, a cadaverina, a putrescina, a espermina e a espermidina (46, 62, 63). No queijo, as aminas biogénicas estão frequentemente associadas a *Enterobacteriaceae*, estando descritas algumas estirpes de *Lactobacillus* com capacidade de formação de histamina, tiramina, putrescina e cadaverina (61).

Contudo, a maior parte dos casos em que grandes quantidades de aminas são produzidas no queijo, a responsabilidade é atribuída às bactérias lácticas com actividade de descarboxilase (61).

2 - Objectivos

Conforme referido anteriormente, o queijo Serra da Estrela é o queijo de fabrico artesanal com maior importância no nosso país. A sua tipicidade e qualidade organoléptica fazem dele um produto alimentar único. Contudo, ao ser fabricado com leite cru e sem métodos de produção padronizados, põe em causa a segurança alimentar, estando sujeito a barreiras de comercialização.

A quantidade e qualidade da flora microbiana do queijo, assim como alguns produtos resultantes do seu metabolismo (ex.: aminas biogénicas), podem pôr em causa a segurança alimentar.

É necessário descobrir métodos de produção padronizados, que permitam garantir não só a segurança alimentar (para que este possa ser certificado) como a qualidade do queijo, de modo a se obter um produto final com a mesma qualidade a nível da textura e do flavor que o produto original. Se estes padrões não forem alcançados, o produto não se torna viável a nível comercial, uma vez que a selecção dos queijos pelo consumidor está principalmente dependente destes factores.

Por isso, é necessário encontrar uma combinação certa de bactérias lácticas que possam ser utilizadas como cultura de arranque e capazes de garantir que o queijo produzido através de métodos padronizados é o mais semelhante possível ao queijo de fabrico artesanal.

Nesse sentido, este trabalho teve como objectivo avaliar a actividade proteolítica de bactérias lácticas isoladas do queijo Serra da Estrela, nomeadamente o *Lactococcus lactis*, o *Lactobacillus brevis* e o *Lactobacillus pentosus*, que podem ser potenciais componentes duma cultura de arranque. Essa avaliação foi feita através da actividade proteolítica sobre a caseína em sistemas modelo (excepto para o *Lactococcus lactis*) e da avaliação preliminar da capacidade de metabolismo de aminoácidos (descarboxilação e desaminação).



3 - Material e Métodos

3.1 - Estirpes microbianas

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes estirpes comerciais: *Lactobacillus brevis* LMG 6906, *Lactobacillus pentosus* LMG 10755 e *Lactococcus lactis* LMG S 19870, obtidas do Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Rijksuniversiteit (Gent, Bélgica); *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10145, *Escherichia coli* NCTC 9001, obtidas do National Collection of Type Cultures (Colindale, Reino Unido); *Salmonella* spp. e *Proteus mirabilis*, obtidas da ESB.

3.2 - Avaliação da proteólise

Para avaliar a proteólise foram utilizadas amostras de queijo preparado com coalho vegetal, sem adição de inóculo (controlo), com 1 % *Lactobacillus brevis*, com 1 % *Lactobacillus pentosus* e com uma mistura *Lactobacillus brevis* + *Lactobacillus pentosus* (1:1). As amostras foram colhidas aos 0, 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de maturação. O azoto solúvel em água (WSN) e o azoto solúvel em ácido tricloroacético a 12 % (m/v) (TCA-SN) foram determinados em amostras de extractos preparados de acordo com o que é descrito por Kuchroo & Fox (67),

com excepção da utilização de um Sorvall Omni-mixer (Dupont Company, EUA) para a homogeneização e o sobrenadante obtido foi filtrado com um papel de filtro Nº 42 (Whatman, Reino Unido). O azoto solúvel em ácido fosfotungstico a 5 % (m/v) (PTA-SN) (Merck, Alemanha) também foi determinado, pelo método de Kjeldahl segundo Stadhouders (68), com excepção dos extractos, que foram preparados conforme o acima descrito (69).

Os extractos solúveis em água (WSE) e os extractos insolúveis em água (WISE) de queijos com 0, 3, 7 e 21 dias de maturação foram liofilizados (HetoDrywinner, Dinamarca). Foram misturados 7 mg de WISE e 25 mg de WSE com o tampão da amostra, constituído por: tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (Merck, Alemanha), 0.12 M; ureia (Merck, Alemanha), 8.2 M; EDTA (Pronolab, Portugal), 2.5 mM; β -mercaptoetanol (Merck, Alemanha), 0.2 M; azul de bromofenol (Merck, Alemanha), 0.01 %, pH 7.6. Depois de misturados, foram dissolvidos e centrifugados (Universal 32R, Heltich, Alemanha) a 10 000 rpm durante 10 minutos, a 4 °C. Foram aplicados nos poços 15 μ l de sobrenadante da amostra e 12 μ l de fracções de padrão de caseína ovina.

Foi realizada uma electroforese de gel poliacrilamida (urea-PAGE) das amostras, de acordo com o método de Andrews (70), com algumas modificações. As análises foram realizadas numa cuba vertical (Bio-Rad, EUA), utilizando um fornecedor de energia PowerPac Universal (Bio-Rad,). Os blocos de gel eram compostos por um gel de empacotamento a 4.2 % e um gel corrida a 12.5 %. O tampão de gel de empacotamento era composto por: Tris (Merck, Alemanha), 0.76 M e ureia (Merck, Alemanha), 9 M, a pH 8.9. A solução tampão da electroforese era constituída por: Tris (Merck, Alemanha), 0.02 M e glicina (Merck, Alemanha), 0.19, a pH 8.9. A corrida foi realizada a 20 °C, a 280 V até ao final do

gel de empacotamento, seguida por uma voltagem de 300 V. Os géis foram corados directamente, segundo o método de Blakesley & Boez (71), com Azul Brillhante de Coomassie G-250 (Merck, Alemanha) e descorados usando água destilada. Depois de descorados, os blocos de gel foram digitalizados (GS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad, EUA). Foram realizadas digitalizações dos electroforetogramas para quantificar as bandas utilizando software densitométrico (Molecular Analyst v1.4 software, Bio-Rad, EUA).



3.3 - Avaliação de algumas vias metabólicas para a caracterização fenotípica das estirpes

Para a realização dos testes para identificação das estirpes (assim como dos teste de avaliação preliminar do metabolismo de aminoácidos) foram utilizadas culturas das três estirpes em teste (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus pentosus*) e das estirpes para controlo dos testes (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*). As culturas de *Lactococcus lactis* cresceram durante 40-48 h a 30 °C em M17 agar (Biokar Diagnostics, França); as culturas de *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus pentosus* cresceram durante 40-48 h a 30 °C em Mann, Rogosa, Sharp (MRS) agar (Biokar Diagnostics, França); as culturas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* cresceram 40-48 h a 37 °C em Plate Count Agar (PCA) (Merck, Alemanha).

Para avaliar a influência do estado das culturas, os testes foram feitos em duas condições (fases) distintas: na primeira fase estudaram-se três estirpes diferentes; enquanto que na segunda fase fixou-se a estirpe e realizou-se a bateria de testes diferentes. Os ensaios foram realizados em triplicado.

3.3.1 - Fermentação da lactose

Tendo como base o método de Drigalski (72), preparou-se meio com a seguinte composição (g/l de água desionizada): peptona (Sigma, Alemanha), 5; extracto de carne (LAB M, Reino Unido), 3; lactose (Merck, Alemanha), 5; azul de bromocresol (Fluka, Suíça), 0.02. Após acerto do pH (6.8 ± 0.2) o meio, distribuído por tubos, foi autoclavado (121 °C, 20 minutos).

Posteriormente à inoculação das culturas das estirpes testadas e dos controlos (controlo positivo - *Escherichia coli* e controlo negativo - *Salmonella* spp.), adicionou-se 1ml de parafina estéril. Incubou-se durante 24 h a 37 °C.

3.3.2 - Teste da β -galactosidase

O meio utilizado para este teste consistia numa mistura de 75 ml de água peptonada e 25 ml de solução orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosida (ONPG) (por cada 100 ml de mistura final).

A água peptonada era constituída (g/l de água desionizada) por: peptona (Sigma, Alemanha), 1; cloreto de sódio (NaCl) (Panreac, Espanha), 0.5. Depois de preparada, foi autoclavada (121 °C, 20 minutos).

A solução ONPG era constituída (em 100 ml) por: 100 ml de solução tampão fosfato (pH 7.0) e 0.6 g de ONPG (Sigma, Alemanha). Para preparar a solução tampão fosfato foram necessários 30.5 ml de hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4) (35.61 g/l) e 19.5ml de dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) (31.21 g/l), acertando o pH (se necessário) e autoclavando (121 °C, 20 minutos). Posteriormente, acrescentou-se ONPG à solução tampão fosfato até dissolução completa.

Procedeu-se à inoculação das três estirpes testadas e dos controlos (*Escherichia coli* – positivo; *Proteus mirabilis* – controlo negativo), e incubou-se a 37 °C durante 24 h.



3.3.3 - Teste fermentativo/oxidativo de açúcares

Preparou-se meio constituído (g/l) por: peptona (Sigma, Alemanha), 2; NaCl (Panreac, Espanha), 5; fosfato de dipotássio (Pronolab, Portugal), 0.3; azul de bromotimol, 0.03; agar nº1 (LAB M, Reino Unido), 2.5. Acertou-se o pH (7.1) do meio e autoclavou-se (121 °C, 20 minutos).

Foram preparadas soluções a 10 % (m/v) de oito açúcares: dextrose (LAB M, Reino Unido), frutose (Merck, Alemanha), galactose (Fluka, Alemanha), glicose (Fluka, Alemanha), lactose (Fluka, Alemanha), maltose (Fluka, Alemanha), manitol (Sigma, Alemanha) e sacarose (Riedel-de Haën, Alemanha). As soluções foram esterilizadas por filtração, utilizando filtros estéreis 0.2 µm (Orange Scientific, Bélgica) e adicionadas ao meio de forma a que a sua concentração final fosse de 1 %, procedendo-se à distribuição por tubos esterilizados.

Inocularam-se os tubos com as culturas das três estirpes testadas e do controlo (*Pseudomonas aeruginosa*), adicionando-se 1 ml de parafina estéril aos tubos correspondentes ao teste de fermentação. Os inóculos foram incubados a 37 °C durante 96 h, observando-se a sua evolução.

3.3.4 - Metabolismo do citrato

Preparou-se, segundo Simmons (73) meio Simmons Citrate Agar (SCA) com a seguinte composição (g/l de água desionizada): cloreto de amónia (Merck, Alemanha), 1; hidrogenofosfato de dipotássio (K₂HPO₄) (Merck, Alemanha), 1;

NaCl (Panreac), 5; citrato de sódio (Merck, Alemanha), 2; sulfato de magnésio ($MgSO_4$) (Merck, Alemanha), 0.2; azul de bromotimol (M&B, Reino Unido), 0.08; agar nº1 (LAB M, Reino Unido), 15. Acertou-se o pH (6.9 ± 0.2) e autoclavou-se ($121^\circ C$, 20 minutos). Os tubos contendo o meio foram inoculados (controlo positivo – *Salmonella* spp., controlo negativo – *Escherichia coli*) e incubados a $37^\circ C$ durante 24 h.

3.3.5 - Teste da urease

Preparou-se meio com a seguinte composição (g/l de água desionizada): extracto de levedura (Biokar), 0.1; fosfato de potássio (K_3PO_4) (Sigma, Alemanha), 0.091; difosfato de sódio (Sigma, Alemanha), 0.095; ureia (Merck, Alemanha), 20; vermelho de fenol, 0.01. O acerto do pH foi feito com a adição de ácido clorídrico (HCl) 0.1 M até haver mudança de cor (de rosa para amarelo), autoclavando-se o meio de seguida ($121^\circ C$, 20 minutos). Acertou-se novamente o pH com HCl 0.1 M esterilizado e distribui-se pelos tubos esterilizados. Depois de inoculados (sendo o controlo positivo o *Proteus mirabilis* e o controlo negativo a *Escherichia coli*), os tubos foram incubados a $37^\circ C$ durante 4 h.

3.3.6 - Descarboxilação de aminoácidos

Preparou-se Meio Base para a Descarboxilase (Difco™), com a seguinte composição (g/l de água desionizada): peptona (Sigma, Alemanha), 5; extracto de levedura (Biokar), 3; dextrose (LAB M, Reino Unido), 1; azul de bromocresol (Fluka, Alemanha), 0.02; aminoácido (Sigma, Alemanha), 5. Acertou-se o pH (6.8 ± 0.2) e autoclavou-se ($121^\circ C$, 20 minutos).

Após inoculação das estirpes testadas e do controlo (1ª fase- *Pseudomonas aeruginosa*; 2ª fase- *Salmonella* spp.), adicionou-se 1 ml de parafina estéril a cada tubo e incubou-se a 37 °C durante 96 h, tendo-se observado a evolução e registado os resultados às 24 h, 48 h, 72 h e 96 h.

Na 2ª fase também foi utilizado um meio com a seguinte composição (g/l): triptona, 5; extracto de levedura (Biokar), 5; NaCl (Panreac), 5; glicose (Fluka, Alemanha) ou dextrose (LAB M, Reino Unido), 1; tween 80, 0.5; sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 0.2; cloreto de cálcio ($CaCO_3$), 0.1; azul de bromocresol (Fluka, Alemanha), 0.06; Sulfato de magnésio tetrahidratado ($MgSO_4 \cdot 4H_2O$), 0.05; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.04; agar nº1 (LAB M, Reino Unido), 20; aminoácido (Sigma, Alemanha), 20. Acertou-se o pH do meio (5.0 ± 0.1) e autoclavou-se (121 °C, 20 minutos). Efectuaram-se diluições até 10^{-6} , a partir da cultura em broth. Após inoculação (em duplicado) das diluições 10^{-5} e 10^{-6} , incubaram-se as placas a 30 °C durante 3-4 dias.

3.3.7 - Teste da Phe/Trp desaminase

Preparou-se meio com a seguinte composição (g/l de água desionizada): peptona (Sigma, Alemanha), 5; extracto de levedura (Biokar), 3; dextrose (LAB M, Reino Unido), 1; agar (LAB M, Reino Unido), 15; Phe (Sigma, Alemanha) ou Trp (Sigma, Alemanha), 5. Autoclavou-se o meio (121 °C, 20 minutos), que foi depois distribuído por placas. Após inoculação (controlo positivo – *Proteus mirabilis*, controlo negativo – *Escherichia coli*), incubou-se a 37 °C durante 24 h. Terminado o período de incubação, adicionaram-se 5 gotas de reagente de cloreto de ferro ($FeCl_3$) (Anexo I).

4- Resultados

4.1 - Actividade Proteolítica

A determinação do WSN, TCA-SN e PTA-SN possibilitou a obtenção de dados experimentais essenciais para a avaliação da actividade proteolítica nos queijos modelo analisados.

O WSN é constituído na sua maioria por péptidos de cadeia longa e média, incluindo também numerosos péptidos de cadeia curta, aminoácidos livres e compostos azotados resultantes do catabolismo dos aminoácidos. A partir do WSN foi calculada a proteólise em extensão, indicador da proteólise primária, tendo em conta que o Ripening Extension Index (REI) é igual à razão entre o WSN e a proteína total (TP).

O TCA-SN, determinado a partir do WSN, consiste principalmente de péptidos de cadeia curta, aminoácidos livres e compostos azotados resultantes do catabolismo dos aminoácidos. A partir do TCA-SN foi calculada a proteólise em profundidade, indicador da proteólise secundária, considerando que o Ripening Depth Index (RDI) é igual à razão entre o TCA-SN e a TP.

O PTA-SN, determinado a partir do WSN, é constituído por aminoácidos livres. O Free Amino Acid Index (FAAI) foi calculado a partir da razão entre PTA-SN e a TP.

Relativamente ao REI (Ilustração 2), os valores mais elevados corresponderam ao *Lactobacillus pentosus*, nos dias 0, 1, 3 e 14; ao *Lactobacillus brevis*, no dia 7; ao controlo, no dia 21 e à mistura (*Lactobacillus brevis* + *Lactobacillus pentosus*), no dia 28. Os valores mais baixos pertenceram à mistura até ao dia 7 e ao *Lactobacillus pentosus*, do dia 14 ao dia 28. O valor máximo do REI (0.66) registado foi para o controlo aos 21 d e o valor mínimo (0.02) no dia 0

pela mistura. Depois de comparar a evolução das amostras, verificou-se que o REI do queijo controlo era inferior ao queijo inoculado com *Lactobacillus pentosus* e superior ao queijo inoculado com *Lactobacillus brevis* para os dias 0, 1, 3 e 14. Excluindo o dia 7 e 21, o REI do *Lactobacillus pentosus* foi sempre superior ao do *Lactobacillus brevis*, sendo a maior diferença observada no dia 14. Comparando o REI da mistura com o do *Lactobacillus brevis* e do *Lactobacillus pentosus*, verificou-se que era inferior até ao dia 7. Verificou-se igualmente que os valores da mistura eram inferiores ao do controlo, excepto para o dia 28, tendo-se registado a maior diferença no dia 21.

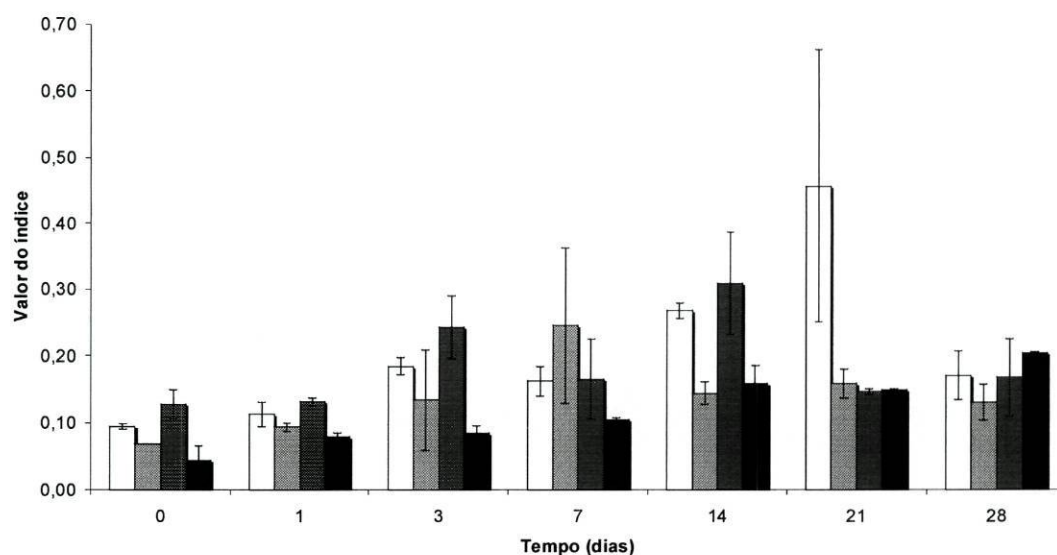


Ilustração 2. Evolução do REI ao longo do tempo de maturação do controlo (□), do *Lactobacillus brevis* (▒), do *Lactobacillus pentosus* (■) e da mistura (■). Cada dado representa a média e a barra de erro representa o desvio padrão baseado em dois replicados.

Relativamente ao RDI (Ilustração 3), os valores mais elevados pertenceram ao *Lactobacillus pentosus*, nos dias 0, 1, 3 e 14; ao *Lactobacillus brevis*, no dia 7 e ao controlo, nos dias 21 e 28. Os valores mais baixos corresponderam à

mistura, com excepção do dia 28 (*Lactobacillus brevis*). O valor máximo (0.61) foi observado no dia 14 para o *Lactobacillus pentosus*. O valor mínimo (0.01) foi registado no dia 0 para a mistura. O RDI do controlo foi inferior ao do *Lactobacillus pentosus* e superior ao do *Lactobacillus brevis*, nos dias 0, 1, 3 e 14. Os valores do índice do *Lactobacillus pentosus* foram superiores aos do *Lactobacillus brevis*, com excepção do dia 7, registando-se a maior diferença no dia 14. O RDI da mistura foi sempre inferior.

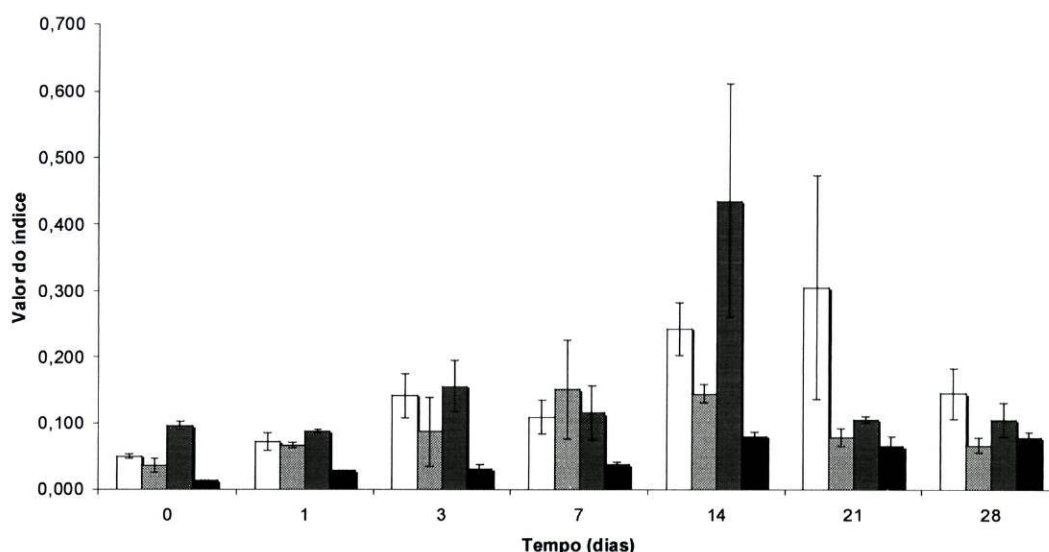


Ilustração 3. Evolução do RDI ao longo do tempo de maturação do controlo (□), do *Lactobacillus brevis* (■), do *Lactobacillus pentosus* (■) e da mistura (■). Cada dado representa a média e a barra de erro representa o desvio padrão baseado em dois replicados.

Em relação ao FAAI (Ilustração 4), os valores mais elevados corresponderam ao *Lactobacillus pentosus*, nos dias 0, 1, 7 e 14 e ao controlo, nos dias 3, 21 e 28. Os valores mais baixos pertenceram à mistura, excepto para o dia 14 (*Lactobacillus brevis*). O valor máximo (0.207) foi registado no dia 1 para o *Lactobacillus pentosus*. O valor mínimo (0.000) foi registado no dia 14 para o

Lactobacillus brevis. O FAAI do controlo foi inferior ao do *Lactobacillus pentosus* e superior ao do *Lactobacillus brevis*, nos dias 1 e 14. Os valores do *Lactobacillus pentosus* foram superiores aos do *Lactobacillus brevis*, excepto no dia 21, registando-se a maior diferença no dia 1. A mistura apresentou valores inferiores aos do *Lactobacillus pentosus* e do *Lactobacillus brevis*, excepto para o dia 14. Os valores da mistura foram também inferiores ao do controlo, observando-se a maior diferença no dia 21.

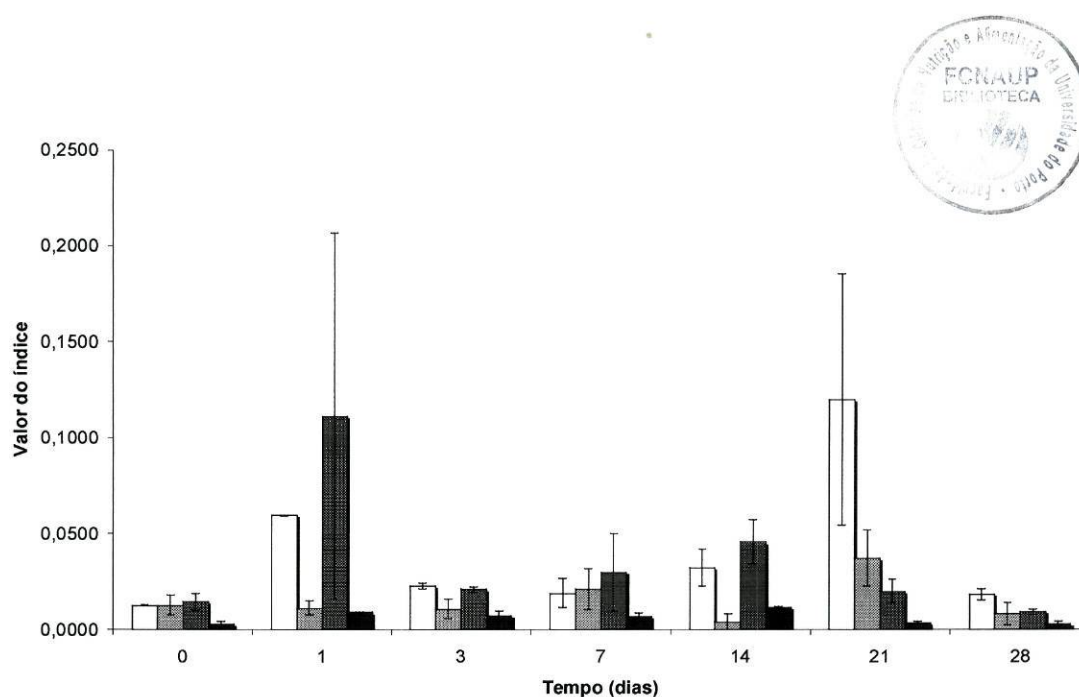


Ilustração 4. Evolução do FAAI ao longo do tempo de maturação do controlo (□), do *Lactobacillus brevis* (▨), do *Lactobacillus pentosus* (■) e da mistura (▩). Cada dado representa a média e a barra de erro representa o desvio padrão baseado em dois replicados.

Posteriormente comparou-se a evolução dos três índices para cada caso, observando-se que os valores mais elevados foram atingidos pelo controlo e pelo *Lactobacillus pentosus*.

No controlo (Ilustração 5), os valores iniciais dos índices eram 0.09 (REI), 0.05 (RDI) e 0.013 (FAAI). A evolução do REI e do RDI foi semelhante, apresentando um pico no dia 3 (com os respectivos valores 0.18 e 0.141) e no dia 21 (onde atingem o valor máximo 0.46 e 0.305, respectivamente). No FAAI, o primeiro pico apareceu no dia 1 (0.059) e o segundo, que corresponde ao valor máximo (0.120), surgiu no dia 21. Entre o dia 0 e o dia 21 o REI, RDI e FAAI registaram um aumento de 184 %, 387 % e 151 %, respectivamente. Como seria de esperar, os valores do REI foram sempre superiores aos do RDI, que por sua vez foram superiores aos do FAAI. Observou-se que o FAAI apresentava uma variação de valores pequena. Apesar das oscilações, os valores finais foram sempre superiores aos iniciais, representando um aumento de 80 % (REI), 191 % (RDI) e 43 % (FAAI).

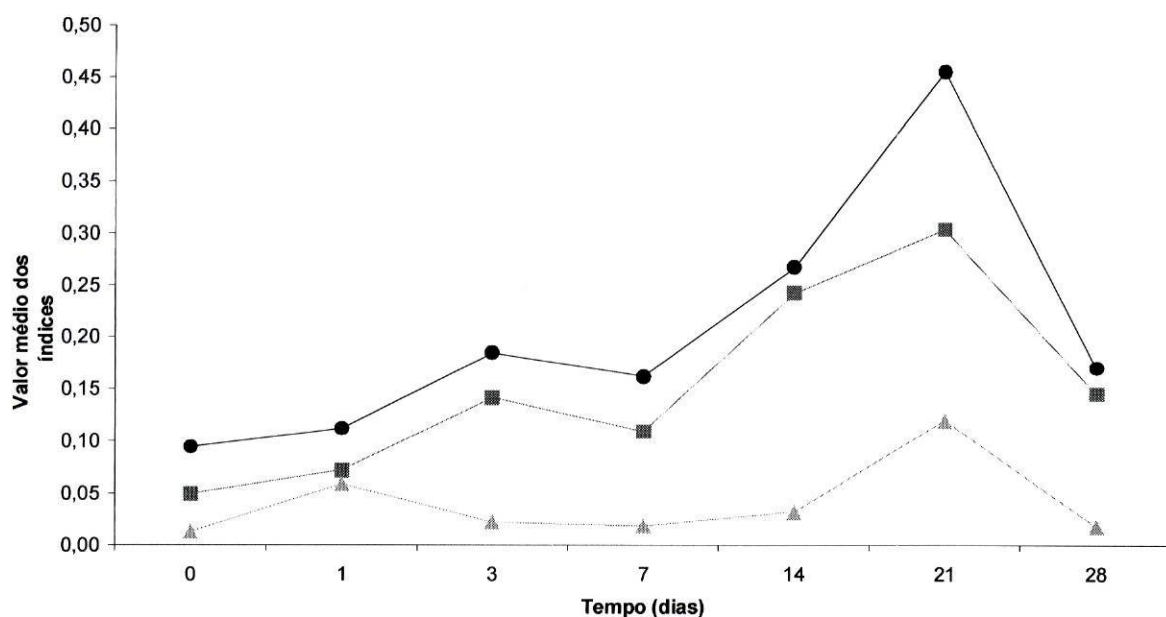


Ilustração 5. Evolução dos valores médios do REI (●), RDI (■) e FAAI (▲) ao longo do tempo de maturação para o controlo.

Para o *Lactobacillus brevis* (Ilustração 6), os valores obtidos inicialmente foram 0.07 (REI), 0.04 (RDI) e 0.013 (FAAI). A evolução do REI e do RDI foi semelhante até ao dia 7, onde ambos os índices atingiram o valor máximo 0.25 e 0.150, respectivamente. Estes valores correspondem a um aumento, em relação aos valores iniciais, de 257 % (REI) e 315 % (RDI). Os valores do FAAI apresentaram pouca oscilação, atingindo o máximo (0.037) no dia 21, representando um aumento de 194 %, comparativamente ao valor inicial. Como seria de esperar, o REI foi superior ao RDI, enquanto que o FAAI foi inferior ao REI e ao RDI. Os valores finais do REI e do RDI foram superiores aos iniciais, apresentando um aumento de 89 % e 85 %, respectivamente. O valor final do FAAI diminuiu 36 % em relação ao valor inicial.

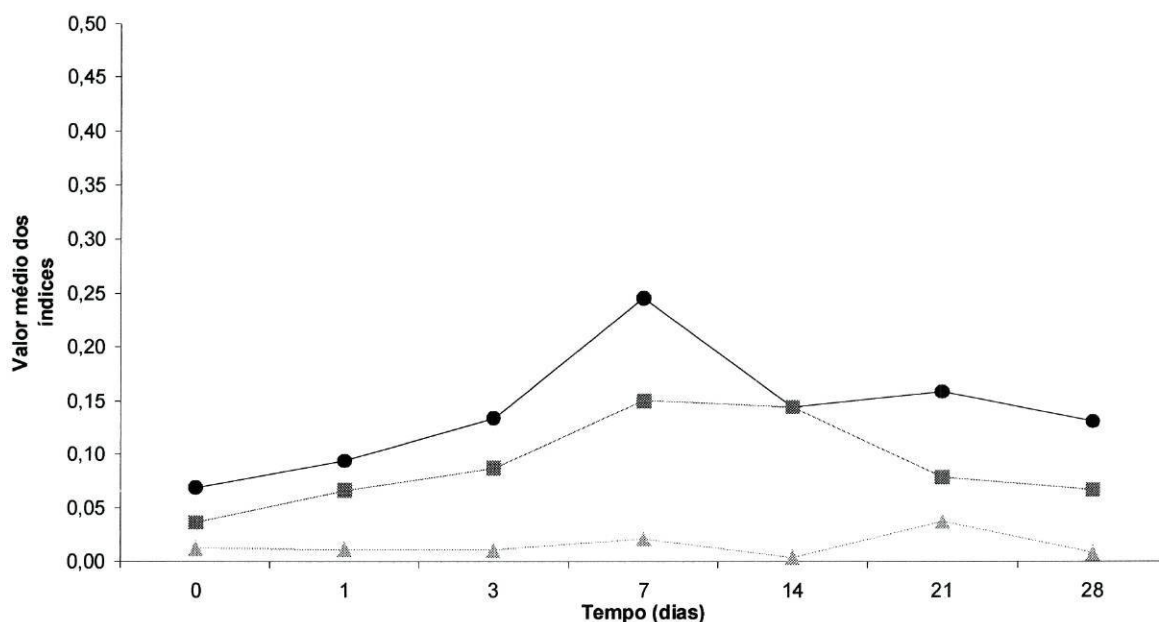


Ilustração 6. Evolução dos valores médios do REI (●), RDI (■) e FAAI (▲) ao longo do tempo de maturação para o *Lactobacillus brevis*.

No *Lactobacillus pentosus* (Ilustração 7) os valores registados inicialmente foram 0.13 (REI), 0.10 (RDI) e 0.014 (FAAI). A evolução do REI e do RDI foi semelhante apresentando um pico aos 3 dias e outro aos 14 dias, onde o valor máximo (0.31 e 0.436, respectivamente) foi atingido. O valor máximo correspondeu a um aumento de 141 % (REI) e 353 % (RDI), relativamente aos valores iniciais. O FAAI manteve-se abaixo de 0.050 nos restantes dias. Com excepção do dia 14, o REI foi superior ao RDI. O RDI foi superior ao FAAI, excepto no dia 1. Os valores finais do REI e do RDI foram superiores aos iniciais, correspondendo a um aumento respectivo de 31 % e 10 %. O valor final do FAAI diminuiu 36 %, comparativamente ao valor inicial.

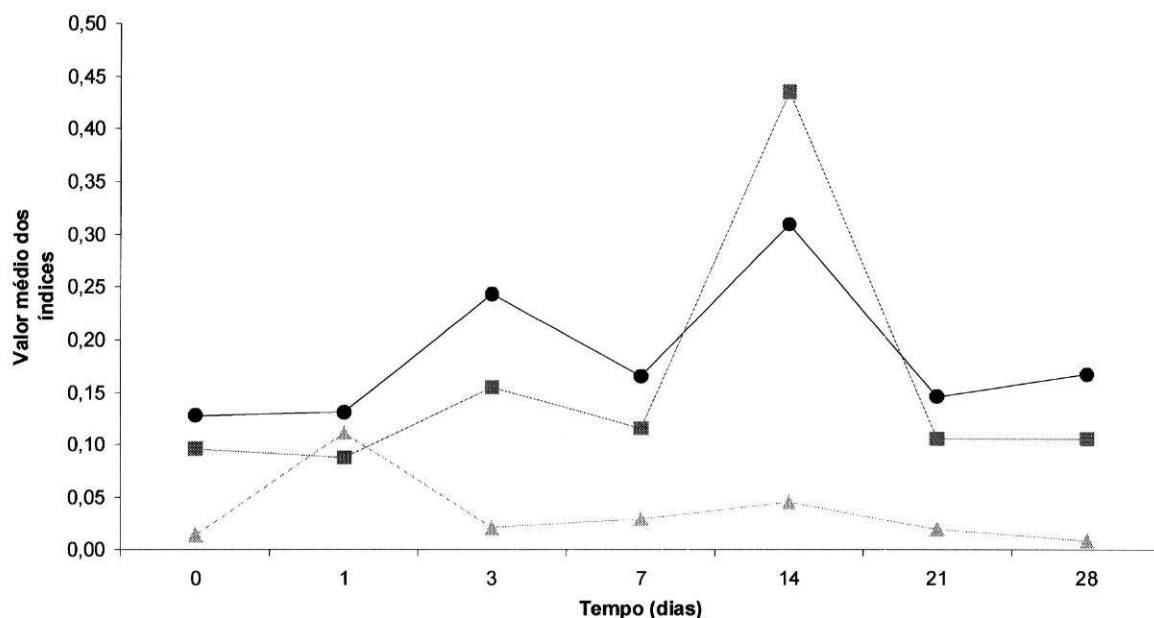


Ilustração 7. Evolução dos valores médios do REI (●), RDI (■) e FAAI (▲) ao longo do tempo de maturação para o *Lactobacillus pentosus*.

Na mistura (Ilustração 8), os valores obtidos inicialmente foram 0.04 (REI), 0.01 (REI) e 0.003 (FAAI). A evolução dos três índices não apresentou grandes oscilações. O REI e o RDI aumentaram gradualmente com o tempo (apenas com uma ligeira diminuição no dia 21). O REI atingiu o valor máximo (0.20) no dia 28, correspondendo a um aumento de 366 % (relativamente ao valor inicial) e o RDI obteve o valor máximo (0.08) no dia 14, correspondendo a um aumento de 514 % (relativamente ao valor inicial). O FAAI manteve-se praticamente constante durante o tempo de maturação, apresentando o valor máximo (0.012) no dia 14, correspondendo a um aumento de 283 %, comparativamente ao valor inicial. O REI foi superior ao RDI que, por sua vez, foi superior ao FAAI. Os valores finais dos índices foram superiores aos valores iniciais, apresentando um aumento de 366 % (REI), 504 % (RDI) e 2 % (FAAI).

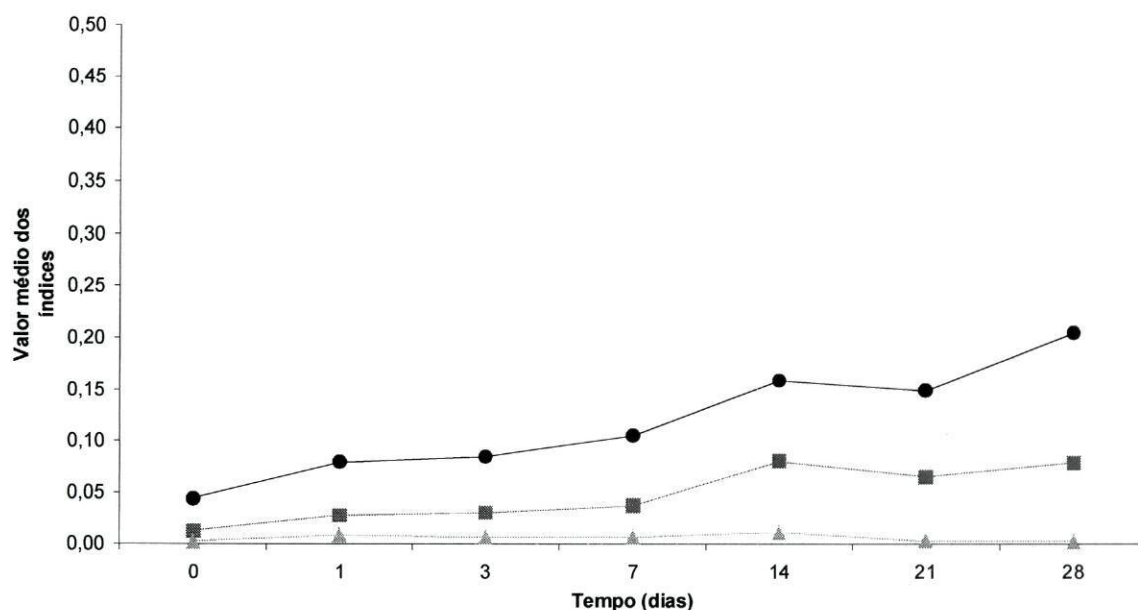


Ilustração 8. Evolução dos valores médios do REI (●), RDI (■) e FAI (▲) ao longo do tempo de maturação para a mistura.

A avaliação dos WISE e dos WSE foi realizada através da análise dos electroforetogramas ureia-PAGE. Os WISE incluíam a caseína, em vários estados de degradação e os WSE incluíam polipéptidos, péptidos e aminoácidos, resultantes da degradação da caseína.

Verificou-se (Ilustração 9), através da análise dos dados relativos aos WISE, que a degradação da β -caseína foi superior à da α_s -caseína em todos os casos. A degradação da β -caseína foi superior com o *Lactobacillus pentosus*, que também apresentou maior quantidade de WISE. Da análise do WSE verificou-se a presença de bandas com maior mobilidade electroforética (correspondente a péptidos) apenas nos queijos modelo inoculados. Em termos comparativos, a presença de *Lactobacillus pentosus* nos queijos modelo (em cultura simples ou em mistura) levou ao aparecimento de maior número de péptidos solúveis (visíveis sob a forma de bandas com maior mobilidade na fracção solúvel) do que a presença de *Lactobacillus brevis*.

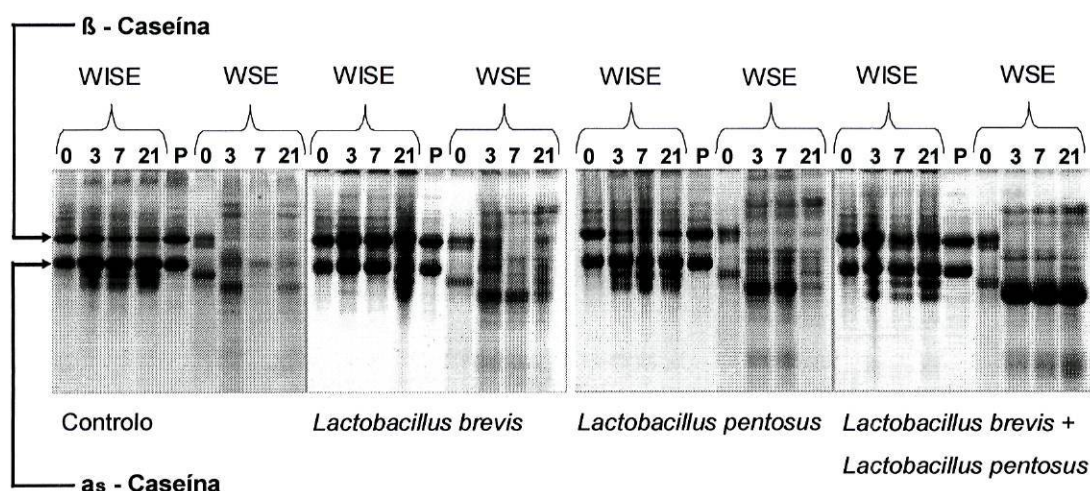


Ilustração 9. Electroforetogramas Ureia-PAGE do WISE e WSE de queijos modelo, manufacturados com cardo, e sem inóculo (controlo), ou inoculado com *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus*, ou com uma mistura das duas, durante a maturação (0, 3, 7 e 21 dias).

4.2 - Avaliação de algumas vias metabólicas para a caracterização fenotípica das estirpes



4.2.1 - Fermentação da lactose

A avaliação da fermentação da lactose foi feita tendo como base a alteração da cor do meio inoculado, devida à influência do pH na cor do azul de bromocresol (indicador). Inicialmente a cor do meio é roxo. Contudo, se o microrganismo inoculado tiver capacidade de fermentar a lactose, irá produzir ácido (láctico), com consequente abaixamento do pH e alteração da cor do meio para amarelo.

As três estirpes analisadas tiveram resultado positivo em ambas as fases do teste. Contudo, no controlo positivo (*Salmonella* spp.) não houve uma alteração tão notória como nas estirpes analisadas, ficando o meio com um tom roxo-amarelado. Ainda assim, a coloração final era diferente da inicial, considerando-se o resultado como não claramente positivo (Tabela 1).

Estirpe analisada	Positivo		Negativo		Não claramente positivo	
	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
<i>Lactococcus lactis</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Lactobacillus pentosus</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	3	3
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	3	3	0	0

Tabela 1. Avaliação da fermentação da lactose.

4.2.2 - Teste da β -galactosidase

A ONPG é um substrato alternativo para a β -galactosidase (possuindo uma estrutura molecular semelhante à lactose, ligando-se à enzima da mesma forma). A ONPG (incolor) é convertida em galactose (incolor) e orto-nitrofenil (ONP)

(amarelo). Assim a existência da enzima é facilmente verificável pela alteração da cor do meio, que passa de incolor para amarelo.

Neste teste registaram-se algumas diferenças de resultados entre as duas fases: o *Lactococcus lactis* só apresentou um resultado negativo na segunda fase, sendo positivo nos outros; o *Lactobacillus brevis* não teve resultados positivos na primeira fase de testes, apresentando dois resultados positivos na segunda fase; o *Lactobacillus pentosus* teve resultados opostos nas duas fases, na primeira só teve positivos, enquanto que na segunda, apenas teve negativos (Tabela 2).

Estirpes analisadas	Positivo		Negativo		Não claramente positivo	
	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
<i>Lactococcus lactis</i>	3	2	0	1	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	2	3	1	0	0
<i>Lactobacillus pentosus</i>	3	0	0	3	0	0
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	0	0	3	3
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	3	3	0	0

Tabela 2. Avaliação da actividade da β -galactosidase.

4.2.3 - Teste fermentativo/oxidativo de açúcares

A avaliação da fermentação e oxidação da dextrose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manitol e sacarose foi feita através da observação da alteração da cor do azul de bromotimol (indicador), como resultado da variação de pH. Assim, com a fermentação ou oxidação de determinado açúcar observa-se um abaixamento de pH, com conseqüente alteração da cor inicial do meio (verde) para amarelo.

Para o *Lactococcus lactis* foram registados na primeira fase três resultados positivos (todos os casos) para a fermentação de: dextrose, frutose, galactose, glicose e lactose, e para a oxidação de: dextrose, frutose e galactose; foram registados dois resultados positivos na oxidação da glicose e apenas um

resultado positivo na oxidação da lactose; para os restantes açúcares, todos os resultados foram negativos. Na segunda fase registaram-se três resultados positivos para a fermentação de: dextrose, frutose, galactose e lactose, e para a oxidação de: frutose, galactose e lactose; registaram-se dois resultados positivos para a oxidação de dextrose; registou-se um resultado positivo para a fermentação da glicose; para os restantes açúcares, todos os resultados foram negativos (Tabela 3) (Tabela 4).

Em relação ao *Lactobacillus brevis* foram observados na primeira fase três resultados positivos na fermentação de todos os açúcares com excepção do manitol, e na oxidação de: frutose, glicose, maltose, manitol e sacarose; foram observados dois resultados positivos na oxidação da dextrose e da lactose; para os restantes açúcares, todos os resultados foram negativos. Na segunda fase observaram-se três resultados positivos na fermentação de todos os açúcares, e na oxidação de: dextrose, glicose, maltose e sacarose; observaram-se dois resultados positivos na oxidação de: frutose, galactose, lactose e manitol (Tabela 3) (Tabela 4). A oxidação da glicose, lactose, maltose e sacarose foi equivalente nas 2 fases. A única diferença distinta está relacionada com a oxidação da galactose, assim sendo, o resultado não é conclusivo.

No *Lactobacillus pentosus* foram registados na primeira fase três resultados positivos na fermentação de: dextrose, frutose, galactose, glicose, lactose, sacarose e manitol, e na oxidação de: dextrose, frutose, galactose, glicose, sacarose, maltose e manitol; foi registado um resultado positivo na fermentação da maltose; na oxidação da lactose, todos os resultados foram negativos. Na segunda fase registaram-se três resultados positivos na fermentação de: dextrose, frutose e sacarose, e na oxidação de: dextrose, glicose, maltose e

sacarose; registaram-se dois resultados positivos na fermentação da maltose e na oxidação da frutose; registou-se um resultado positivo na fermentação da glicose e do manitol; para os restantes açúcares, todos os resultados de fermentação e de oxidação foram negativos (Tabela 3) (Tabela 4).

Açúcar	Estirpes analisadas															
	<i>Lactococcus lactis</i>				<i>Lactobacillus brevis</i>				<i>Lactobacillus pentosus</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	1ª fase		2ª fase		1ª fase		2ª fase		1ª fase		2ª fase		1ª fase		2ª fase	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Dextrose	3	0	2	1	2	1	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
Frutose	3	0	3	0	3	0	2	1	3	0	2	1	0	3	2	1
Galactose	3	0	3	0	0	3	2	1	3	0	0	3	3	0	1	2
Glicose	2	1	0	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0
Lactose	1	2	3	0	2	1	2	1	0	3	0	3	0	3	0	0
Maltose	0	3	0	3	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3
Manitol	0	3	0	3	3	0	2	1	3	0	0	3	3	0	2	1
Sacarose	0	3	0	3	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3

Tabela 3. Avaliação da oxidação de açúcares.

Açúcar	Estirpes analisadas															
	<i>Lactococcus lactis</i>				<i>Lactobacillus brevis</i>				<i>Lactobacillus pentosus</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	1ª fase		2ª fase		1ª fase		2ª fase		1ª fase		2ª fase		1ª fase		2ª fase	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Dextrose	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3
Frutose	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	2
Galactose	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3
Glicose	3	0	1	2	3	0	3	0	3	0	1	2	0	3	0	3
Lactose	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3
Maltose	0	3	0	3	3	0	3	0	1	2	2	1	0	3	0	3
Manitol	0	3	0	3	0	3	3	0	3	0	1	2	0	3	0	2
Sacarose	0	3	0	3	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0	3

Tabela 4. Avaliação da fermentação de açúcares.

4.2.4 - Metabolismo do citrato

A avaliação dos resultados foi feita pela alteração da cor do indicador (azul de bromotimol). A formação de compostos alcalinos (resultantes do metabolismo

do citrato) aumenta o pH do meio, passando este de verde para azul, indicando que a reacção é positiva.

Todos os resultados obtidos em ambas as fases com o *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus pentosus* foram negativos (Tabela 5) contra o controlo positivo de *Salmonella* spp..

Estirpes analisadas	Positivo		Negativo	
	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	3	3
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	0	3	3
<i>Lactobacillus pentosus</i>	0	0	3	3
<i>Escherichia coli</i>	0	0	3	3
<i>Salmonella</i> spp.	3	3	0	0



Tabela 5. Avaliação da capacidade de metabolização do citrato.

4.2.5 - Teste da urease

A avaliação dos resultados foi feita pela alteração da cor do indicador (vermelho de fenol). Se a reacção for positiva, a cor muda de amarelo para rosa ou vermelho, como consequência da formação de amónia por acção da urease.

Todos os resultados obtidos em ambas as fases com o *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus pentosus* foram negativos (Tabela 6) em comparação com o controlo positivo de *Proteus mirabilis*.

Estirpe analisada	Positivo		Negativo	
	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	3	3
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	0	3	3
<i>Lactobacillus pentosus</i>	0	0	3	3
<i>Escherichia coli</i>	0	0	3	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3	3	0	0

Tabela 6. Avaliação da actividade da urease.

4.2.6 - Descarboxilação de aminoácidos

O meio utilizado neste teste permitiu a avaliação da presença de descarboxilases, que removem o grupo carboxilo do aminoácido. Com a fermentação da dextrose, há formação de compostos ácidos, que diminuem o pH do meio e alteram a cor do meio de roxo para amarelo. Esta diminuição de pH aliada à presença de aminoácidos induz a descarboxilação. Se o microrganismo for capaz de descarboxilar o aminoácido presente no meio haverá formação de compostos alcalinos, o que é suficiente para aumentar o pH do meio e tornar a cor do meio roxo (74). Para evitar a existência de falsos positivos utilizou-se, para cada estirpe analisada, um tubo controle sem adição de aminoácido, o que possibilitou a observação da capacidade de fermentação da dextrose.

O *Lactococcus lactis* apresentou (Tabela 7), quer na primeira, quer na segunda fase três resultados positivos para a Arg e His, sendo negativos todos os resultados para os restantes aminoácidos.

No caso do *Lactobacillus brevis* (Tabela 7) apenas foram registados três resultados positivos para a His, tanto na primeira como na segunda fase. Os resultados da primeira fase para os restantes aminoácidos foram negativos. Na segunda fase foi também registado um resultado positivo para a Tyr, sendo negativos os resultados para os restantes aminoácidos.

Na primeira fase de testes para o *Lactobacillus pentosus* (Tabela 7) apenas se registaram três resultados positivos para His. Para todos os outros aminoácidos os resultados foram negativos. Na segunda fase, registaram-se três resultados positivos para a His e Thr; registaram-se dois resultados positivos para a Met e Trp; registou-se um resultado positivo para o Asp, Phe, Leu, Lys, Pro, Tyr e Val. Os resultados para os restantes aminoácidos foram negativos.

Após análise dos resultados da segunda fase foi necessário recorrer à utilização de um novo meio, mais específico para bactérias lácticas, para confirmar a actividade das descarboxilases para alguns aminoácidos. A avaliação dos resultados obtidos é semelhante aquela utilizada anteriormente, tendo em conta a alteração da cor do meio por fermentação do açúcar e pela descarboxilação do aminoácido. Também foi analisada a diferença de resultados entre meios contendo glicose ou dextrose. Utilizou-se como controlo positivo o *Lactococcus lactis* para a Arg.

Assim, para o *Lactobacillus pentosus* foram analisados os aminoácidos: Asp, Phe, Leu, Lys, Met, Pro, Tyr e Val, os quais tinham dado resultados inconclusivos com o meio anterior. Para o *Lactobacillus brevis* foi analisado o Tyr. Não se registou diferenças nos resultados entre os meios preparados com glicose ou com dextrose (dados não apresentados).

Aminoácido	Estirpes analisadas															
	<i>Lactococcus lactis</i>				<i>Lactobacillus brevis</i>				<i>Lactobacillus pentosus</i>				<i>P. aeruginosa</i>		<i>Salmonella spp.</i>	
	1ª fase		2ª fase		1ª fase		2ª fase		1ª fase		2ª fase		1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Ala	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	3	0	0	3
Arg	3	0	3	0	0	3	0	3	0	3	0	3	3	0	3	0
Asn	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	3	0	0	3
Asp	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	1	2	0	3	3	0
Cys	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3
Gln	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	2	1	0	3
Glu	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	3	0	0	3
Gly	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	3	0	0	3
His	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	0	3
Ile	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3
Leu	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	1	2	3	0	0	3
Lys	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	1	2	3	0	3	0
Met	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	2	1	2	1	0	3
Phe	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	1	2	3	0	0	3
Pro	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	1	2	0	3	0	3
Ser	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	3	0	1	2	0	3
Thr	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	3	0	0	3	0	3
Trp	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	2	1	3	0	0	3
Tyr	0	3	0	3	0	3	1	2	0	3	1	2	3	0	0	3
Val	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	1	2	3	0	0	3

Tabela 7. Avaliação qualitativa da descarboxilação de aminoácidos.

4.2.7 - Teste da Phe/Trp desaminase

A desaminação da Phe e do Trp pode resultar na formação de α -cetoácidos (por acção de desidrogenases), que reagem com o cloreto de ferro. A formação de um produto de cor verde com a adição do reagente indica a existência de ácido fenilpirúvico, resultante da desaminação da Phe. A formação de um produto cor de laranja ou castanho indica a existência de ácido indolpirúvico, resultante da desaminação do Trp.

Todos os resultados obtidos em ambas as fases com o *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus pentosus* foram negativos (Tabela 8).

Estirpes analisadas	Phe				Trp			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	3	3	0	0	3	3
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	0	3	3	0	0	3	3
<i>Lactobacillus pentosus</i>	0	0	3	3	0	0	3	3
<i>Echerichia coli</i>	0	0	3	3	0	0	3	3
<i>Proteus mirabilis</i>	3	3	0	0	3	3	0	0

Tabela 8. Avaliação qualitativa da Phe desaminase e Trp desaminase.

5 - Discussão

A análise dos índices de proteólise durante a maturação permitiu confirmar que a proteólise em extensão da caseína foi superior à proteólise em profundidade, o que está de acordo com os dados encontrados por Tavarina *et al.* (75). A análise global dos resultados obtidos indica que a actividade proteolítica no queijo modelo controlo (cuja acção é devida ao cardo) é superior aquele inoculado com *Lactobacillus brevis* ou com a mistura das estirpes, e inferior aquele contendo *Lactobacillus pentosus*. Quando inoculados com as estirpes

isoladas, os queijos modelo exibem uma actividade proteolítica superior à dos que estão inoculados com a mistura das estirpes, com excepção do último dia de amostragem, onde o REI foi superior na cultura mista.

Da avaliação da evolução do REI e do RDI ao longo dos 28 dias de maturação, o que mais se destacou foram as diferenças encontradas relativamente aos dias onde se registaram os valores máximos. Assim, os valores máximos para o REI e o RDI foram registados nos dias 21, 7 e 14, para o controlo, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus pentosus*, respectivamente. Na mistura, os valores máximos foram observados no dia 28 (REI) e no dia 14 (RDI). Apesar de não existirem dados experimentais que permitam justificar indubitavelmente a causa destas diferenças, pode-se considerar uma possível relação entre a actividade metabólica dos microrganismos presentes na matriz e a actividade das cardosinas. Tendo em conta que: 1) a actividade das cardosinas é favorecida pela diminuição do pH; 2) a formação de adenosina trifosfato (ATP) (necessário na biossíntese) a partir da fermentação de hidratos de carbono é uma característica essencial nas bactérias lácticas (76); 3) o total de hidratos de carbono disponíveis no leite de ovelha corresponde maioritariamente à lactose (16); 4) o produto final da fermentação da lactose pelas bactérias lácticas é predominantemente o lactato, que por sua vez contribui para a diminuição do pH (76), pode-se deduzir que o aumento da actividade das cardosinas poderá coincidir com o período de crescimento exponencial das bactérias presentes na matriz. Adicionalmente, o período de crescimento exponencial poderá também estar associado a uma maior actividade proteolítica das bactérias, de modo a obter quantidades suficientes de aminoácidos, essenciais para a síntese de

proteínas, como fonte energética, para regular o pH interno, para regenerar co-substratos e para a biossíntese (31, 43, 44).

Decorridos os 28 dias de maturação, o queijo modelo controlo exibiu valores do FAAl superiores ao das restantes situações. De uma forma geral, nos queijos modelos inoculados com as estirpes isoladas os valores do FAAl foram superiores aos queijos modelo contendo a cultura mista. Seria de esperar que o aumento dos índices de proteólise se reflectisse no aumento dos valores de aminoácidos livres existentes na matriz, principalmente por parte dos queijos inoculados. Contudo, o que se verificou foi que os valores do FAAl sofreram poucas oscilações ao longo do período de maturação, mantendo-se dentro de níveis consideravelmente inferiores comparativamente com os níveis apresentados pelo REI e pelo RDI; inclusivamente os valores de FAAl registaram diminuições perceptíveis após os valores máximos atingidos. Tal facto pode ser devido à utilização de aminoácidos no metabolismo das bactérias existentes na matriz, conforme já foi mencionado. Os picos registados ao longo da maturação estarão mais provavelmente relacionados com a actividade das enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos. Esta pode ser menor numa fase inicial do crescimento bacteriano (controlo e *Lactobacillus pentosus*); ser insuficiente para acompanhar a produção de aminoácidos pela proteólise (controlo); diminuir numa fase de menor actividade metabólica (*Lactobacillus brevis*).

Apesar de não existirem dados sobre os produtos que foram formados a partir do metabolismo dos aminoácidos, poder-se-á inferir que durante a fase inicial de crescimento e durante o crescimento exponencial a utilização de aminoácidos está principalmente ligada a processo anabólicos. Com a estabilização do crescimento, é mais provável que as vias catabólicas tenham

uma maior expressão. Adicionalmente, a morte e lise celular numa fase mais avançada poderão contribuir para a produção de compostos responsáveis pelo desenvolvimento do flavor, o que justifica que este trabalho possa ser estendido para tempos superiores de maturação e correspondente amostragem.

A realização da electroforese permitiu confirmar os dados fornecidos pelos índices de maturação. Apesar de não ser possível estabelecer uma relação directa, poder-se-á especular que os aminoácidos presentes na matriz sejam, pelo menos em parte, reflexo dos aminoácidos que constituem a β -caseína. Os aminoácidos existentes em maior quantidade na β -caseína ovina são a Pro, Leu, Gln, Val, Glu, Ser, Lys e Thr (77, 78). De facto, segundo o estudo de Tavarina *et al* (75), os aminoácidos presentes em maior quantidade no queijo são a Leu, Val, Glu e Lys. Adicionalmente, a presença de um representativo número de bandas com maior mobilidade electroforética nos queijos modelo contendo *Lactobacillus pentosus* poderá reflectir a sua maior actividade proteolítica correlacionada com os maiores índices de RDI.

O perfil metabólico obtido nos testes de identificação esteve de acordo com o que se encontra descrito na literatura, salvo algumas excepções. Contudo, estes testes apresentaram algumas limitações inerentes à sua natureza exclusivamente qualitativa e à susceptibilidade a erros associados à preparação dos meios, à sensibilidade de produtos utilizados (ONPG), ao operador e a possíveis condições adversas existentes no laboratório. Estas limitações foram perceptíveis nos resultados contraditórios obtidos em alguns testes (principalmente para o *Lactobacillus pentosus*), que obrigaram à sua repetição. O exemplo mais evidente alude ao teste da β -galactosidase e ao teste oxidativo e fermentativo de açúcares (lactose), onde os resultados obtidos para a actividade enzimática nem sempre

estiveram de acordo com o teste fermentativo da lactose, que provavelmente estará menos sujeito a alterações decorrentes dos erros acima mencionados; apenas o *Lactobacillus pentosus* registou uma correlação entre a ausência de actividade da β -galactosidase e a falta de fermentação da lactose na 2ª fase de experiências. É de realçar que este teste é de importância dado um dos passos integrantes no metabolismo da lactose ser a ruptura da ligação glicosídica das duas hexoses que a constituem: galactose e glicose, que são posteriormente convertidas em glicose-6-P para utilização na glicólise (28). Em muitas bactérias lácticas esta reacção é catalizada pela β -galactosidase, que degrada a lactose transportada para o espaço intracelular por um transportador da lactose (permease) (28).

O perfil metabólico observado no *Lactococcus lactis* esteve de acordo com o que já se encontra descrito, com excepção da fermentação da sacarose e da dextrose (30, 35, 39, 79-82). O resultado negativo observado na fermentação maltose permitiu concluir que a estirpe utilizada não pertencia à subespécie *lactis*, o que é confirmado com o resultado obtido no metabolismo do citrato, pois das estirpes pertencentes ao *Lactococcus lactis* apenas a variante *diacetylus* da subespécie *lactis* demonstra capacidade de metabolizar o citrato (30, 39).

O perfil metabólico encontrado para o *Lactobacillus brevis* também se encontrava de acordo com o descrito na literatura, demonstrando capacidade de fermentar todos os açúcares testados (35, 79, 80, 83, 84). O resultado positivo para a galactose, lactose e manitol permitiu concluir que a estirpe utilizada não pertencia à variante *lindneri* (79).

A comparação dos resultados obtidos com os dados descritos na literatura, relativamente ao *Lactobacillus pentosus* foi extremamente complicada, visto que a

maioria da informação disponível refere-se à distinção entre este e o *Lactobacillus plantarum* através da utilização de kits ou métodos baseados na reacção em cadeia da polimerase (PCR) (85). Do perfil metabólico observado para o *Lactobacillus pentosus*, apenas foi possível confirmar a fermentação da maltose, lactose e sacarose de acordo com o que está descrito (85). Por outro lado, o resultado negativo da fermentação da glicose não está de acordo com o princípio de que todas as bactérias lácticas produzem ácido láctico a partir de hexoses (35).

O resultado negativo na pesquisa da desaminase dos aminoácidos aromáticos Phe e Trp, nas estirpes estudadas indica que, provavelmente, o catabolismo destes aminoácidos é iniciado por outra reacção, nomeadamente a transaminação. A transaminação dos aminoácidos aromáticos é responsável pela produção de indol piruvato, fenil piruvato e *p*-OH-fenil piruvato, a partir do Trp, Phe e Tyr, respectivamente (31, 43, 47, 53). Posteriormente, o indol piruvato pode ser descarboxilado em indol 3-acetaldeído, indol 3-aldeído ou escatol; o fenil piruvato em fenilacetaldeído ou benzaldeído (se da descarboxilação resultar a remoção de 2 átomos de carbono); e o *p*-OH-fenil piruvato em *p*-OH-fenilacetaldeído, OH-benzaldeído (se forem removidos 2 átomos de carbono) ou *p*-cresol (31, 43, 47). Através de reacções de redução, o indol 3-acetaldeído é transformado em triptofol, o fenilacetaldeído em feniletanol e o *p*-OH-fenilacetaldeído em *p*-OH-feniletanol (31, 43, 47). Por reacções de oxidação, o indol 3-acetaldeído é convertido em ácido indol-3-acético, o fenilacetaldeído em ácido fenilacético e o *p*-OH-fenilacetaldeído em ácido *p*-OH-fenilacético (31, 43, 47). No *Lactococcus lactis* e nos *Lactobacillus*, os α -cetoácidos podem ser convertidos, alternativamente, em hidroxiaácidos (53).

No teste de descarboxilação de aminoácidos constatou-se que o *Lactococcus lactis* possui descarboxilase da Arg e que todas as estirpes testadas possuem descarboxilase da His. Já foi demonstrado que os *Lactobacillus* são capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos e que o *Lactobacillus brevis* é uma bactéria produtora de aminas (62). Porém, os resultados obtidos por *Leuschner et al* (86) mostraram que *Lactobacillus brevis* também apresentava potencial para descarboxilar a Phe e a Tyr (uma observação não conclusiva neste estudo), para além de registar produção de histamina a partir da His. Apesar do teste ser qualitativo e não quantitativo, a evidência da existência de descarboxilases capazes de originar aminas biogénicas acarreta consigo algumas preocupações ao nível da saúde do consumidor. A presença de histamina nos alimentos não é necessariamente perigosa (64). Quando estão presentes em pequenas quantidades, são facilmente toleradas, devido à existência, a nível do tracto intestinal, de um sistema de desintoxicação composto por uma diamina oxidase e uma histamina *N*-metil transferase, que convertem a histamina em produtos não tóxicos (64). Todavia, o metabolismo da histamina é inibido na presença de outras aminas (incluindo tiramina, triptamina, β -feniletilamina, espermina e espermidina), originando casos de intoxicação (46, 63, 64). Depois do peixe, o queijo é o alimento mais associado a intoxicações com histamina (62). As aminas biogénicas formadas a partir da Arg podem ser transformadas em *N*-nitrosaminas por acção do calor ou pela exposição a nitritos em condições semelhantes às encontradas no estômago (64). As *N*-nitrosaminas são carcinogénicas para várias espécies de animais e representam um perigo potencial para os humanos (64).

6 - Conclusões

A análise global dos queijos modelos inoculados relativamente à evolução dos índices de maturação e de aminoácidos livres, e dos electroforetogramas permitiu concluir que a utilização da estirpe *Lactobacillus pentosus* é a mais vantajosa e que a associação das duas estirpes de *Lactobacillus* se revelou desfavorável, estando evidenciados os seus efeitos antagónicos.

Contudo, é preciso ter em consideração que o tempo de maturação utilizado pode não ter sido suficiente para que as conclusões, formadas a partir da avaliação dos dados obtidos, sejam precisas e irrefutáveis. É vivamente aconselhado o prolongamento deste estudo para tempos de maturação mais próximos da realidade do queijo Serra da Estrela para que sejam confirmadas as tendências observadas.

A avaliação preliminar do metabolismo de aminoácidos permitiu concluir que o *Lactococcus lactis* possui descarboxilase da His e da Arg, e o *Lactobacillus brevis* e o *Lactobacillus pentosus* possuem descarboxilase da His. Os resultados obtidos alertam para a possibilidade de formação de aminas biogénicas. Todavia, serão necessários estudos que permitam avaliar a actividade enzimática das descarboxilases e a formação (qualitativa e quantitativa) de aminas biogénicas em sistemas modelo, de forma a saber se os níveis atingidos poderão pôr em causa a saúde dos consumidores.

Adicionalmente, será necessário complementar os dados adquiridos sobre o metabolismo proteico destas estirpes através de estudos que possibilitem avaliar a actividade enzimática das aminotransferases, desaminases e descarboxilases, e a formação de tióis e outros compostos do flavor. Só assim se poderá saber se

estas estirpes possuem as características necessárias à sua inclusão numa potencial cultura de arranque para a produção de queijo Serra da Estrela.

Em conclusão, as características organolépticas únicas do queijo Serra da Estrela são responsáveis pelo seu estatuto de produto tradicional e pela sua importância a nível gastronómico. O seu valor nutricional é reconhecido do ponto de vista do teor em proteínas, vitaminas e minerais, existindo no entanto a necessidade de ponderação de consumo pelo perfil lipídico que lhe é característico. Em situações mais específicas, como algumas patologias, o seu consumo deve ser avaliado e ponderado caso a caso.

As informações obtidas no trabalho contribuem para um melhor conhecimento das estirpes estudadas, necessário para se conseguir produzir um queijo capaz de responder às exigências ao nível da segurança alimentar mantendo as características organolépticas e nutricionais do produto original, fornecendo também algumas linhas orientadoras para trabalhos a desenvolver no futuro.



7 - Referências Bibliográficas

1. Robinson R, Batt C, Patel P. Encyclopedia of food microbiology. London: Academic Press; 2000. p. 372-95.
2. Tsakalidou E, Kotzekidou P. Fermentation biotechnology of animal based traditional foods of the middle east and mediterranean region. In: Shetty K, Paliyath G, Pometto A, Levin R, editores. Food biotechnology. 2nd ed. Florida: CRC Press; 2006. [citado em: 2006 Mai 18]. Cap. 3.20. Disponível em: http://www.foodnetbase.com/books/4046/DK3098_C3_20.pdf.
3. Lawley R. Microbiology handbook. Dairy products. 2nd ed. London: Food RA leatherhead publishing; 2001. p. 65-72.
4. Adams M, Moss M. Food microbiology. 2nd ed.: Royal Society of Chemistry; 2000. p. 315-37.
5. ICMSF. Microbial ecology of foods: food commodities. Academic Press; 1980. p. 499-505.
6. Perry KSP. Cheese: Chemical, biochemical and microbiological aspects [Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos]. Quimica Nova. 2004 [citado em: 2006 Mar 06]; 27(2):293-300. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-30944442821&partner=40&rel=R4.5.0>
7. Gunasekaran S, Ak M. Cheesemaking: an overview. Cheese rheology and texture. Florida: CRC Press; 2003. [citado em: 2006 Jul 27]. Cap. 1. Disponível em: http://www.foodnetbase.com/books/1137/TX218_01.pdf.
8. ICMSF. Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities. Maryland: Aspen Publishers; 2000. p. 549-59.

9. Rodrigues R, de Almeida J, Pereira C, Gomes D, Madanelo J, Oliveira M, et al. Queijo Serra da Estrela :processos tradicionais e inovações tecnológicas [Cadernos de divulgação]. Coimbra: DRABL- Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral; 2000. p. 7-84.
10. Macedo AC, Malcata FX, Oliveira JC. The technology, chemistry, and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*. 1993; 76:1725-39.
11. Macedo AC, Costa ML, Malcata FX. Changes in the microflora of Serra cheese: Evolution throughout ripening time, lactation period and axial location. *International Dairy Journal*. 1996 [citado em: 2006 Mai 29]; 6(1):79-94. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030466830&partner=40&rel=R4.5.0>
12. Macedo AC, Tavares TG, Malcata FX. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese [Short Communication]. *Food Microbiology*. 2004 [citado em: 2006 Mai 25]; 21(2):233-40. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-1442314221&partner=40&rel=R4.5.0>
13. Freitas C, Malcata FX. Microbiology and biochemistry of cheeses with Appellation d'Origine Protégée and manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*. 2000; 83:584-602.
14. Aviso/94. *Diário da República*. II Série; nº 21 (1994 Jan 26).
15. Despacho 6/94. *Diário da República*. II Série; nº 21 (1994 Jan 26).
actobacillus brevis. In: Robinson R, Batt C, Patel P, editores. *Encyclopedia of food microbiology*. London: Academic Press; 2000. Vol. 2, p. 1144-51.

16. Tabela da composição de alimentos. Lisboa: Centro de Segurança Alimentar e Nutrição: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge; 2006. p. 22-129.
17. Chapman H, Sharpe M. Microbiology of cheese. In: Robinson R, editor. Dairy microbiology: the microbiology of milk products. Elsevier Applied Science Publishers; 1981. Vol. 2, p. 157-81.
18. Fox P, Kelly A. The caseins. In: Yada R, editor. Proteins in food processing. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2004. [citado em: 2006 Ago 22]. Cap. 3. Disponível em: http://www.foodnetbase.com/books/1592/wp2536_CH_03.pdf.
19. Linden G, Lorient D. New ingredients in food processing: biochemistry and agriculture. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 1999. [citado em: 2006 Ago 15]. Cap. 5. Disponível em: <http://www.foodnetbase.com/books/853/05.pdf>.
20. Lucey JA, Johnson ME, Horne DS. Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. Journal of Dairy Science. 2003 [citado em: 2006 Jun 01]; 86(9):2725-43. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0642371612&partner=40&rel=R4.5.0>
21. Farkye M. Cheese: microbiology of cheese-making and maturation. In: Robinson R, Batt C, Patel P, editores. Encyclopedia of food microbiology. London: Academic Press; 2000. Vol. 1, p. 381-86.
22. Dahl S, Tavaría FK, Xavier Malcata F. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. International Dairy Journal. 2000 [citado em: 2006 Mai 29]; 10(4):255-62.



Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033837760&partner=40&rel=R4.5.0>

23. Bárcenas P, Elortondo F, Salmerón J, Albisu M. Sensory profile of ewe's milk cheeses. *Food Sci Tech Int.* 2001; 7(4):347-53.

24. Forde A, Fitzgerald GF. Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour. *Current Opinion in Biotechnology.* 2000 [citado em: 2006 Jun 04]; 11(5):484-89. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033772403&partner=40&rel=R4.5.0>

25. Steele J, Johnson ME. Fermented dairy products. In: Doyle M, Beauchat L, Montville T, editores. *Food microbiology: fundamentals and frontiers.* Washington, D.C.: ASM Press; 1997. Cap. 31, p. 581-92.

26. Larsson A. Relationship between yeast and lactic acid bacteria in the manufacture of fermented dairy products [Doutoramento]. Faculty of the Graduate School of the University of Minnesota; 1998.

27. McSweeney PLH. Biochemistry of cheese ripening [Symposium Contribution]. *International Journal of Dairy Technology.* 2004 [citado em: 2006 Ago 20]; 57(2-3):127-44. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-2442666400&partner=40&rel=R4.5.0>

28. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, editores. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects.* 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2004. [citado em: 2006 Jul 27]. Cap 1. Disponível em: <http://biblioteca.up.pt>.

29. Frank H. Dictionary of food microbiology. Lancaster: Technomic publishing; 1992. Lactic acid bacteria; p. 66-251.
30. Somkuti G. Lactic acid bacteria. In: Lederberg J, editor. Encyclopedia of microbiology. 2nd ed.: Academic Press; 2000. Vol. 3, p. 1-4.
31. Christensen JE, Dudley EG, Pederson JA, Steele JL. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. 1999 [citado em: 2006 Jun 04]; 76(1-4):217-46. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0032872645&partner=40&rel=R4.5.0>
32. Girgis H, Smith J, Luchansky J, Klaenhammer T. Stress adaptations of lactic acid bacteria. In: Yousef A, Juneja V, editores. Microbial stress adaptation and food safety. Florida: CRC Press; 2003. [citado em: 2006 Ago 14]. Cap. 6. Disponível em: http://www.foodnetbase.com/books/1104/TX69124_06.pdf.
33. Erdogan A, Gurses M. Lactic acid bacteria isolating from blue mouldy Tulum cheese produced with *Penicillium roqueforti*. International Journal of Food Properties. 2005 [citado em: 2006 Jun 04]; 8(2):405-11. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-24644464653&partner=40&rel=R4.5.0>
34. Engels W, Vlieg J, Smit G. Flavour formation in cheese. In: Smit G, editor. Dairy processing: improving quality. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2003. [citado em: 2006 Mar 06]. Cap. 22. Disponível em: http://www.foodnetbase.com/books/1260/WP1758_ch22.pdf.



35. Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999; 50:131-49.
36. Picon A, De Torres B, Gaya P, Nuñez M. Cheesemaking with a *Lactococcus lactis* strain expressing a mutant oligopeptide binding protein as starter results in a different peptide profile. *International Journal of Food Microbiology*. 2005 [citado em: 2006 Jun 04]; 104(3):299-307. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-26644469280&partner=40&rel=R4.5.0>
37. Courtney P. *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and *cremoris*. In: Robinson R, Batt C, Patel P, editores. *Encyclopedia of food microbiology*. London: Academic Press; 2000. Vol. 2, p. 1166-71.
38. Curtin AC, De Angelis M, Cipriani M, Corbo MR, McSweeney PLH, Gobbetti M. Amino acid catabolism in cheese-related bacteria: selection and study of the effects of pH, temperature and NaCl by quadratic response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology*. 2001 [citado em: 2006 Jun 04]; 91(2):312-21. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034925062&partner=40&rel=R4.5.0>
39. Mäyrä -Mäkinen A, Bigret M. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, editores. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2004. [citado em: 2006 Jul 18]. Cap. 5. Disponível em: http://www.foodnetbase.com/books/4263/DK1291_C05.pdf.
40. Urbach G. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products [Review]. *International Dairy Journal*. 1995; 5:877-903.

41. Lortal S, Chapot-Chartier MP. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese [Review]. *International Dairy Journal*. 2005 [citado em: 2006 Jun 04]; 15(6-9):857-71. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-19744366387&partner=40&rel=R4.5.0>
42. Yvon M, Thirouin S, Rijnen L, Fromentier D, Gripon JC. An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997 [citado em: 2006 Jun 06]; 63(2):414-19. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030999851&partner=40&rel=R4.5.0>
43. Ardö Y. Flavour formation by amino acid catabolism [Research review paper]. *Biotechnology Advances*. 2006 [citado em: 2006 Mar 01]; 24(2):238-42. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-31744438501&partner=40&rel=R4.5.0>
44. Williams AG, Noble J, Tammam J, Lloyd D, Banks JM. Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. 2002 [citado em: 2006 Mai 25]; 12(10):841-52. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036395878&partner=40&rel=R4.5.0>
45. Morales P, Fernández-García E, Gaya P, Nuñez M. Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*. 2003; 13:201-09.



46. Flick G, Ankenman Granata L. Biogenic amines in foods. In: Dąbrowski W, Sikorski Z, editores. Toxins in food. Florida: CRC Press; 2005. [citado em: 2006 Ago 17]. Cap. 6. Disponível em: http://www.foodnetbase.com/books/1680/1904_ch06.pdf.
47. Yvon M, Rijnen L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. International Dairy Journal. 2001 [citado em: 2006 Mai 25]; 11(4-7):185-201. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034878905&partner=40&rel=R4.5.0>
48. Tanous C, Kieronczyk A, Helinck S, Chambellon E, Yvon M. Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. 2002 [citado em: 2006 Mar 06]; 82(1-4):271-78. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036693035&partner=40&rel=R4.5.0>
49. Helinck S, Le Bars D, Moreau D, Yvon M. Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. Applied and Environmental Microbiology. 2004 [citado em: 2006 Jun 04]; 70(7):3855-61. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-3242771565&partner=40&rel=R4.5.0>
50. Rijnen L, Courtin P, Gripon JC, Yvon M. Expression of a heterologous glutamate dehydrogenase gene in *Lactococcus lactis* highly improves the conversion of amino acids to aroma compounds. Applied and Environmental Microbiology. 2000 [citado em: 2006 Jun 04]; 66(4):1354-59. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034071740&partner=40&rel=R4.5.0>

51. Rijnen L, Yvon M, Van Kranenburg R, Courtin P, Verheul A, Chambellon E, et al. Lactococcal aminotransferases AraT and BcaT are key enzymes for the formation of aroma compounds from amino acids in cheese. *International Dairy Journal*. 2003 [citado em: 2006 Jun 04]; 13(10):805-12. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0142031425&partner=40&rel=R4.5.0>
52. Fernández De Palencia P, De La Plaza M, Amárita F, Requena T, Peláez C. Diversity of amino acid converting enzymes in wild lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006 [citado em: 2006 Mai 25]; 38(1-2):88-93. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-27844593337&partner=40&rel=R4.5.0>
53. Marilley L, Casey MG. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains [Review]. *International Journal of Food Microbiology*. 2004 [citado em: 2006 Mai 29]; 90(2):139-59. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0347931878&partner=40&rel=R4.5.0>
54. Hansen BV, Houlberg U, Ardo Y. Transamination of branched-chain amino acids by a cheese related *Lactobacillus paracasei* strain. *International Dairy Journal*. 2001 [citado em: 2006 Jun 04]; 11(4-7):225-33. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034871470&partner=40&rel=R4.5.0>
55. Tavaría FK, Tavares TG, Silva-Ferreira AC, Malcata FX. Contribution of coagulant and native microflora to the volatile-free fatty acid profile of an artisanal cheese. *International Dairy Journal*. 2006 [citado em: 2006 Jul 15]; 16(8):886-94.



Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-33646194383&partner=40&rel=R4.5.0>

56. Bourdat-Deschamps M, Le Bars D, Yvon M, Chapot-Chartier MP. Autolysis of *Lactococcus lactis* AM2 stimulates the formation of certain aroma compounds from amino acids in a cheese model. *International Dairy Journal*. 2004 [citado em: 2006 Jun 04]; 14(9):791-800. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-3042842894&partner=40&rel=R4.5.0>

57. Smit G, Verheul A, Van Kranenburg R, Ayad E, Siezen R, Engels W. Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International*. 2000 [citado em: 2006 Jun 04]; 33(3-4):153-60. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034064507&partner=40&rel=R4.5.0>

58. Tavaría FK, Dahl S, Carballo FJ, Malcata FX. Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 2002 [citado em: 2006 Jun 04]; 85(10):2462-70. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036782553&partner=40&rel=R4.5.0>

59. Lonvaud-Funel A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2001 [citado em: 2006 Jun 04]; 199(1):9-13. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035873493&partner=40&rel=R4.5.0>

60. Cotter P, Hill C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003; 67(3):429-53.

61. Novella-Rodríguez S, Veciana-Nogués MT, Roig-Sagués AX, Trujillo-Mesa AJ, Vidal-Carou MC. Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*. 2002 [citado em: 2006 Jun 04]; 85(10):2471-78. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0036780392&partner=40&rel=R4.5.0>
62. Silla Santos MH. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996 [citado em: 2006 Jun 04]; 29(2-3):213-31. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0005225952&partner=40&rel=R4.5.0>
63. McCabe B. Dietary counseling to prevent food–drug interactions. In: McCabe B, Frankel E, Wolfe J, editores. *Handbook of food and drug interactions*. USA: CRC Press; 2003. [citado em: 2006 Mai 18]. Cap. 14. Disponível em: http://www.foodnetbase.com/books/1113/1531_14.pdf.
64. Shalaby AR. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996 [citado em: 2006 Jun 04]; 29(7):675-90. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0030265217&partner=40&rel=R4.5.0>
65. Valsamaki K, Michaelidou A, Polychroniadou A. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*. 2000 [citado em: 2006 Jun 04]; 71(2):259-66. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033865493&partner=40&rel=R4.5.0>
66. Pinho O, Ferreira IMPLV, Mendes E, Oliveira BM, Ferreira M. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese. *Food Chemistry*. 2001 [citado em: 2006 Jun 04];



<http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034766985&partner=40&rel=R4.5.0>

67. Kuchroo C, Fox P. Soluble nitrogen in Cheddar cheese. Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft*. 1982; 37:331–35.
68. Stadhouders J. The hydrolysis of protein during the ripening of Dutch cheese. The enzymes and the bacteria involved. *Netherlands Milk and Dairy Journal*. 1960; 14:83–110.
69. IDF. Cheese and processed cheese products. Determination of total protein. Kjeldahl method. IDF Standard nº 25. Bruxelles: International Dairy Federation; 1985.
70. Andrews A. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*. 1983; 50:45-55.
71. Blakesley R, Boezi J. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry*. 1977; 82:580–81.
72. Drigalski C. Uber ein verfahren zum nachweis der typhusbacillen. *Z Hyg Infekt*. 1902; 39:283-300.
73. Simmons J. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolating of certain fungi. *Journal of Infectious Diseases*. 1926; 39:209-41.
74. Bonev S, Zakhariiev Z, Gentchev P. Comparative study of media for determination of lysine decarboxylase activity. *Applied Microbiology*. 1974; 27(3):464-68.

75. Tavaría FK, Franco I, Carballo FJ, Malcata FX. Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*. 2003 [citado em: 2006 Mai 29]; 13(7):537-45. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037967959&partner=40&rel=R4.5.0>
76. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, editores. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2004. [citado em: 2006 Jul 27]. Cap. 1. Disponível em: http://www.foodnetbase.com/books/4263/DK1291_C01.pdf.
77. Blackburn D, Hobbs A, Rosen J. Rat β casein DNA: sequence analysis and evolutionary comparisons. *Nucleic Acids Research*. 1982; 10(7):2295-307.
78. Richardson B, Mercier J. The primary structure of the ovine beta-caseins. *European Journal of Biochemistry*. 1979; 99:285-97.
79. Mossel D, Moreno B, Sturijk C. *Microbiología de los alimentos*. Segunda ed. Zaragoza: Editorial Acribial, SA; 2003. p. 23-7.
80. Sneath P, Mair N, Sharpe M, JG H. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, USA: Williams & Wilkins; 1986. p. 1048-231.
81. Wood B. *Microbiology of fermented foods*. 2nd ed. London, UK: Blackie academic & professional; 2001. p. 265-304.
82. Batt C. *Lactococcus*: introduction. In: Robinson R, Batt C, Patel P, editores. *Encyclopedia of food microbiology*. London: Academic Press; 2000. 1164-66.
83. Teixeira P. *Lactobacillus: Lactobacillus brevis*. In: Robinson R, Batt C, Patel P, editores. *Encyclopedia of food microbiology*. London: Academic Press; 2000. Vol. 2, p. 1144-51.



84. Badisa A, Guetarnib D, Moussa Boudjemac B, Hennic D, Kihal M. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*. 2004; 21:579-88.
85. Osawa R, Kuroiso K, Goto S, Shimizu A. Isolation of tanin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66(7):3093-97.
86. Leuschner RGK, Kurihara R, Hammes WP. Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*. 1998 [citado em: 2006 Jun 04]; 44(1-2):15-20. Disponível em: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031764614&partner=40&rel=R4.5.0>

8 - Índice de Anexos

Anexo I - Reagente de FeCl_3 a1

Anexo IReagente de cloreto de ferro (FeCl_3) (100 ml):

Dissolveram-se 12 g de FeCl_3 em 94,6 ml de água desionizada e adicionaram-se lentamente 5,4 ml de HCl concentrado (37%). Depois de preparada, a solução foi armazenada no frigorífico (4°C).