



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DA MICROBIOTA LÁCTICA EM LEITES FERMENTADOS
ARTESANALMENTE CONSUMIDOS NO SUL DE ANGOLA

DEOLINDA PAULINO CAMARADA EMBALÓ

TESE DE DOUTORAMENTO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ESPECIALIDADE SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Reitor da Universidade de Lisboa

ORIENTADORA

Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso

VOGAIS

Doutor Buenaventura Guamis López

Doutor António Salvador Ferreira

Henriques Barreto

Doutor Luís Avelino da Silva

Coutinho Patarata

Doutora Maria Eduarda Madeira Potes

Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso

Doutora Marília Catarina Leal Fazeres Ferreira

COORIENTADOR

Doutor Buenaventura Guamis López

COORIENTADOR

Doutor Joaquim Morais

2014

LISBOA

À memória de meus Pais

Agradecimentos

Antes de mais a DEUS, pelo dom da vida, pela protecção e por me dar forças em todos os momentos difíceis ao longo da realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Gabriela Veloso, minha orientadora científica, por me ter aceite como sua orientanda, pela disponibilidade, prontidão em me ajudar e apoiar nas diferentes tarefas, pelos seus ensinamentos, por toda a ajuda na escrita da tese, pela paciência e amizade demonstradas.

Ao Professor Doutor Buenaventura Guamis Lopes, meu co-orientador científico, pela orientação, incentivo, amizade e pelo apoio material e financeiro sem o qual não seria possível a realização desta tese.

Ao Professor Doutor Joaquim Morais, meu co-orientador por todo o contributo e dedicação prestados na realização desta tese.

À Professora Doutora Monserrat Llagostara, pela simpatia e pela ajuda na realização das análises de biologia molecular.

À Professora Doutora Maria Pillar Cortes Garmendia, pela ajuda na realização das análises de biologia molecular.

Ao Professor Doutor Jesus Piedrafita pela ajuda no tratamento estatístico dos resultados, por todas as sugestões no que tange a apresentação dos mesmos.

À Dr^a Marta Castel-Branco pela ajuda na interpretação da análise estatística.

À equipa de investigação do CERPTA, em particular à Natália e à Sónia pela ajuda prestada aquando da produção dos leites fermentados e na realização da análise sensorial.

Ao Dr. Simão Esperança, pela disponibilidade em atender o meu pedido de socorro sempre que necessário.

À empresa Águas da Chela no Lubango pela disponibilização do laboratório de Bacteriologia para a realização de algumas análises.

À Direcção Nacional do Instituto de Investigação Veterinária (IIV) pelo acolhimento e disponibilização do Laboratório de Tecnologia de Alimentos no Lubango para a realização das análises.

À Direcção Provincial da Agricultura do Lubango pelo apoio prestado aquando das deslocações às áreas de colheita.

Aos colegas do Laboratório Regional do IIV do Lubango pela amizade e por todo o apoio prestado.

À Fundação Calouste Gulbenkian e ao Instituto Nacional de Gestão de Bolsas de Estudo de Angola (INGBEA), pelas bolsas de Doutoramento concedidas.

À Direcção da Faculdade de Medicina Veterinária de Angola pela ajuda prestada durante as deslocações à província da Huíla para a realização dos trabalhos.

À minha família em especial ao meu filho Erivaldo pelo apoio e incentivo demonstrados ao longo deste percurso.

A todos quanto de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho. O meu muito obrigado!

Resumo

Estudo da microbiota láctica em leites fermentados artesanalmente consumidos no sul de Angola

O *omavele* é um leite fermentado artesanalmente produzido pelas populações pastoris do sul e sudoeste de Angola. Os leites fermentados artesanalmente constituem uma parte importante da dieta das populações africanas e, para além de fornecerem nutrientes, têm a vantagem de se conservarem por longos períodos de tempo devido ao baixo pH e à presença de compostos que inibem o desenvolvimento tanto de microrganismos patogénicos como dos de decomposição. O processo de fabrico do *omavele* consiste em colocar o leite de vaca, imediatamente depois da ordenha, numa cabaça contendo ou não raízes ou cascas de plantas para acelerar a sua coagulação e a formação do “ngundi”. A fermentação decorre em cerca de 9 horas à temperatura ambiente.

O objetivo do nosso estudo foi caracterizar a microbiota láctica presente no *omavele* de produção artesanal, para se poderem produzir fermentos que serão utilizados na produção industrial do *omavele*. Analisou-se a composição química e a qualidade higio-sanitária do *omavele* tradicional.

Nas 57 amostras de *omavele* colhidas em diferentes localidades da província da Huíla os teores médios microbianos foram: Lactobacilos ($6,8 \log_{10}$ ufc/mL), Lactococos ($6,24 \log_{10}$ ufc/mL), Leveduras ($5,82 \log_{10}$ ufc/mL), Enterococos ($4,48 \log_{10}$ ufc/mL), Micrococos ($3,74 \log_{10}$ ufc/mL), Enterobactérias ($3,26 \log_{10}$ ufc/mL) e Aeróbios totais a 30°C ($6,31 \log_{10}$ ufc/mL).

A identificação genética de 141 isolados, por técnicas de biologia molecular, revelou que as espécies mais identificadas foram *Lb. plantarum*/*Lb. pentosus* (31,20%), *Lb. casei*/*Lb. paracasei* (7,09%), *Lb. plantarum* (4,34%), *Kazachstania unispora* (9,92%), *Saccharomyces cerevisiae* (8,51%) e *Issatchenkia orientalis* (8,51%). Foram selecionadas estirpes para se constituírem três fermentos (FO1, FO2 e FO3) que foram usados para a produção industrial de três leites fermentados (O1, O2 e O3), cuja avaliação microbiológica 30 dias pós-produção revelou teores de microrganismos viáveis $\geq 7 \log_{10}$ ufc/mL, demonstrando uma boa capacidade de sobrevivência ao processamento industrial. Após avaliação sensorial o *omavele* O1 foi o eleito entre os 3 leites produzidos.

Palavras-Chave: *omavele*, leite fermentado, Angola, PCR, produção industrial e avaliação sensorial.

Abstract

Study of lactic microbiota in fermented milk consumed in the south of Angola

The *omavele* is a fermented milk produced by artisan shepherd populations of the south and southwest Angola. The handmade fermented milks are an important part of the diet of African populations. In addition to providing nutrients they have the advantage of long shelf life due to the low pH and the presence of compounds that inhibit the growth of both pathogenic and spoilage microorganisms. The manufacturing process of *omavele* involves placing the cow's milk, immediately after milking, in a gourd containing or not roots or bark of a plant to accelerate the coagulation and the formation of "ngundi". Fermentation takes place in about 9 hours at room temperature.

The aim of our study was to characterize the lactic microbiota present in handmade *omavele*, to be able to produce yeasts that will be used in the industrial production of *omavele*. We analyzed the chemical composition and the hygienic quality of traditional handmade *omavele*.

In 57 *omavele* samples collected in different localities of Huíla province the microbial average counts were: Lactobacillus (6,8 log₁₀ cfu/mL), Lactococci (6,24 log₁₀ cfu/mL), Yeast (5,82 log₁₀ cfu/mL), Enterococci (4,48 log₁₀ cfu/mL) Micrococci (3,74 log₁₀ cfu/mL), *Enterobacteriaceae* (3,26 log₁₀ cfu /mL) and Total Aerobes at 30 ° C (6,31 log₁₀ cfu/mL).

The genetic identification of 141 isolates by techniques of molecular biology has shown that most species were *Lb. plantarum* / *Lb. pentosus* (31,20%), *Lb. casei* / *Lb. paracasei* (7,09%), *Lb. plantarum* (4,34%), *Kazachstania unispora* (9,92%), *Saccharomyces cerevisiae* (8,51%) and *Issatchenkia orientalis* (8,51%). Strains were selected to constitute three yeasts (FO1, FO2 and FO3) that were used for the industrial production of three fermented milks (O1, O2 and O3), whose microbiological evaluation 30 days after production revealed levels of viable microorganisms $\geq 7 \log_{10}$ cfu/mL, demonstrating a good ability for industrial processing. After the sensory evaluation *omavele* O1 has been selected among the 3 milks produced.

Key words: *omavele*, fermented milk, Angola, PCR, industrial production and sensory evaluation.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	6
2.1. Leites fermentados	6
2.1.1. Definições e generalidades	6
2.1.2. Tipos de leites fermentados	7
2.1.3. Leites artesanalmente fermentados	13
2.2. Produção de leites artesanalmente fermentados em África	20
2.2.1. Modo de produção	20
2.2.2. Recipientes	21
2.3. Microbiologia dos leites fermentados	22
2.3.1. Características gerais das bactérias produtoras de ácido láctico	24
2.3.1.1. Taxonomia e morfologia	24
2.3.1.2. <i>Lactobacillus</i>	25
2.3.1.3. <i>Lactococcus</i>	26
2.3.1.4. <i>Leuconostoc</i>	27
2.3.1.5. <i>Enterococcus</i>	27
2.3.1.6. <i>Pediococcus</i>	28
2.3.2. Leveduras	29
2.3.2.1. Características gerais	29
2.4. Metabolismo das bactérias produtoras do ácido láctico	30
2.5. Composição química dos leites fermentados	31
2.6. Fermentos lácticos	32
2.6.1. Definição e classificação	32
2.6.2. Função dos fermentos lácticos	34
2.6.3. Composição dos fermentos lácticos	35
2.6.4. Fermentos naturais	35
2.6.5. Fermentos lácticos não tradicionais	37
2.7. Segurança higio-sanitária dos alimentos fermentados	37
2.8. Importância nutricional e terapêutica dos leites fermentados	39

2.8.1. Importância nutricional dos leites fermentados	39
2.8.2. Importância terapêutica dos leites fermentados	42
2.8.3. Efeito probiótico	42
2.9. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas em leites fermentados	47
2.9.1. Produção de compostos antimicrobianos	47
2.9.2. Bacteriocinas	49
2.10. Importância das bactérias lácticas na indústria de laticínios	51
3. Materiais e Métodos	53
3.1. Produção artesanal do <i>omavele</i>	53
3.1.1. Ordenha	53
3.1.2. Incubação e batadura	53
3.2. Recolha de amostras	55
3.3. Análises físico-químicas	56
3.4. Análises microbiológicas	57
3.4.1. Contagem de microrganismos Aeróbios Totais a 30°C	57
3.4.2. Contagem de Bactérias lácticas	57
3.4.2.1. Contagem de Lactobacilos	57
3.4.2.2. Contagem de Lactococos	57
3.4.2.3. Contagem de Enterococos	58
3.4.3. Contagem de Bolores e Leveduras	58
3.4.4. Contagem de Micrococos	58
3.4.5. Contagem de Enterobactérias	59
3.5. Isolamento e conservação de microrganismos	59
3.6. Identificação genotípica de Bactérias lácticas e Leveduras	59
3.6.1. Revivificação dos isolados selecionados	60
3.6.2. Extração de ADN	60
3.6.3. Amplificação do ADN por PCR	60
3.7. Seleção de estirpes para uso industrial	61
3.8. Produção de <i>omavele</i> na oficina tecnológica	63
3.9. Avaliação sensorial das três produções de <i>omavele</i>	64
3.10. Avaliação microbiológica das três produções de <i>omavele</i>	65
3.11. Análise estatística	65
4. Resultados e Discussão	66
4.1. Composição química do <i>omavele</i>	66
4.2. Teores de microrganismos isolados de amostras de <i>omavele</i>	67

4.3. Espécies identificadas no <i>omavele</i> em cada área de colheita	76
4.4. Produção de leites fermentados tradicionais	92
4.5. Composição microbiana dos fermentos	93
4.6. Avaliação sensorial das três produções de <i>omavele</i>	94
4.7. Avaliação microbiológica dos leites fermentados O1, O2 e O3.	96
5. Conclusões	99
6. Perspetivas	100
Bibliografia	101
ANEXOS	

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa de Angola e Província da Huíla em destaque.	3
Figura 2. Leite acidificado <i>omavele</i> de produção industrial – Huíla.	4
Figura 3. Leite fermentado <i>omaere</i> ou <i>omavele</i> produzido na República da Namíbia.	5
Figura 4. Esquema geral da fermentação da glucose em ácido láctico. Adaptada de Caplice & Fitzgerald (1999).	31
Figura 5. Ordenha manual	53
Figura 6. Transferência do leite para a cabaça	53
Figura 7. Agitação da cabaça (batedura)	54
Figura 8. <i>Omavele</i>	54
Figura 9. Preparação artesanal do <i>omavele</i>	55
Figura 10. Mapa da província da Huíla – localidades em estudo.	56
Figura 11. Teores médios dos diferentes microrganismos isolados em amostras de <i>omavele</i> durante o período em estudo.	70
Figura 12. Espécies identificadas em isolados de amostras de <i>omavele</i> colhidas na localidade do Toco em 2009 e 2010.	76
Figura 13. Espécies identificadas em isolados de amostras de <i>omavele</i> colhidas na localidade da Chibia em 2007, 2009 e 2010.	77
Figura 14. Espécies identificadas em isolados de amostras de <i>omavele</i> colhidas na localidade da Humpata em 2007, 2009 e 2010	78
Figura 15. Espécies identificadas em isolados de amostras de <i>omavele</i> colhidas na localidade de Rio da Areia em 2007, 2009 e 2010.	79
Figura 16. Espécies identificadas em isolados de amostras de <i>omavele</i> colhidas na localidade de Mulondo em 2007.	80
Figura 17. Espécies identificadas em isolados de amostras de <i>omavele</i> colhidas na localidade da Huíla em 2010	81
Figura 18. Perfil sensorial dos leites fermentados O1, O2 e O3 produzidos com os fermentos FO1, FO2 e FO3.	95

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais leites fermentados consumidos nas diferentes regiões do mundo. Adaptada de Chandan (2013).	7
Tabela 2. Bactérias lácticas isoladas de produtos lácteos fermentados em África. Adaptada de Narvhus & Gadaga (2003).	23
Tabela 3. Composição química dos leites fermentados. Adaptada de Oberman & Libudzisz (1998)..	32
Tabela 4. Composição química de alguns leites fermentados tradicionais produzidos em África. Adaptada de Bille (2009).	32
Tabela 5. Microrganismos utilizados na produção tradicional de leites fermentados. Adaptada de Oberman & Libudzisz (1998)	36
Tabela 6. Oligonucleótidos universais.	61
Tabela 7. Estirpes utilizadas para a produção do FO1 (TOCO).	62
Tabela 8. Estirpes utilizadas para a produção do FO2 (CHIBIA).	63
Tabela 9. Estirpes utilizadas para a produção do FO3 (RIO DA AREIA)..	63
Tabela 10. Concentração de microrganismos (\log_{10} ufc/mL) em 120 mL de cada um dos fermentos – FO1, FO2 e FO3 – na primeira e na segunda produção de <i>omavele</i>	64
Tabela 11. Concentração (\log_{10} ufc/mL) dos 3 grupos de microrganismos nos leites - O1, O2 e O3 – na primeira e na segunda produção de <i>omavele</i> , antes da fermentação.	64
Tabela 12. Composição química de amostras de <i>omavele</i>	66
Tabela 13. Teores médios (\log_{10} ufc/mL) dos diferentes microrganismos presentes no <i>omavele</i> obtidos nos diferentes anos.	68
Tabela 14. Teores médios (\log_{10} ufc/mL) dos diferentes microorganismos presentes no <i>omavele</i> obtidos nas diferentes localidades.	69
Tabela 15. pH e resultado da avaliação sensorial dos três <i>omaveles</i> (O1, O2 e O3) produzidos na oficina tecnológica do CERPTA	95
Tabela 16. Teores de microrganismos viáveis nos leites fermentados O1, O2 e O3 (\log_{10} ufc/mL)	97

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ATP – Adenosina Trifosfato

BAL – Bactérias lácticas ou bactérias produtoras de ácido láctico

CERPTA – Centro de Investigação de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Autónoma de Barcelona

CLA – Conjugated linoleic acid (Ácido linoleico conjugado)

DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)

dNTP – deoxynucleotide triphosphate (deoxinucleotido trifosfato)

EPS – Exopolissacáridos

FAO – Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FO1 – Fermento FO1

FO2 – Fermento FO2

FO3 – Fermento FO3

GRAS – Generally Recognized as Safe (substâncias geralmente reconhecidas como seguras)

G+C – guanina+citosina do ADN

IgA – Imunoglobulina A

KAA – Kanamycin Aesculin Azide Agar (Canamicina Esculina Azida Agar)

LPS – Lipopolissacarídeos

Lb. – *Lactobacillus*

Lc. – *Lactococcus*

Leuc. – *Leuconostoc*

MSA – Manitol Salt Agar

MRS – Man, Rogosa and Sharpe Agar

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação para Biotecnologia)

NSLAB – Non starter lactic acid bacteria (Bactérias produtoras de ácido láctico não iniciadoras)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCA – Plate Count Agar

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reacção em cadeia da polimerase)

PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Electroforese em campo pulsado)

RGSA – Rogosa Agar

RB – Rose Bengal Chloranfenicol Agar

UAB – Universidade Autónoma de Barcelona

UFC/mL – Unidades Formadoras de Colónias por mililitro.

VRBGA – Violet Red Bile Glucose Agar

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

1. Introdução

A origem dos leites fermentados remonta à antiguidade, há mais de 10.000 anos, e provavelmente está associada à história da própria civilização e à época em que o modo de vida do Homem foi mudando, quando este começou a domesticar as espécies animais produtoras de leite e a utilizar o seu leite (Tamime, 2002; Narvhus, 2003).

Naquela época as tribos nômadas desenvolveram a arte de conservar o leite que produziam mediante o armazenamento em odres e recipientes de cerâmica ou de pele de animais, onde o leite fermentava graças à microbiota láctica acidentalmente adquirida após a ordenha, tornando-o num produto mais apetecível, cuja vida útil era mais longa do que a da matéria-prima (Oberman & Libudzisz, 1998; Ordoñez *et al.*, 2005).

Existem evidências arqueológicas de que algumas civilizações, como a dos Sumérios e Babilônios na Mesopotâmia, a dos egípcios no tempo dos Faraós no nordeste de África e a dos Indo-Arianos na Ásia, já praticavam uma agricultura e pecuária que lhes permitia domesticar alguns animais produtores de leite como vacas, búfalas, cabras, ovelhas e éguas, em que o leite era destinado a ser consumido fresco ou fermentado. Provavelmente os leites fermentados são originários do Médio Oriente e Balcãs e foram evoluindo através dos tempos devido à criatividade culinária dos habitantes destas regiões (Tamime, 2002).

Atualmente existem cerca de 400 nomes genéricos para leites fermentados artesanais e industrializados, e muitos deles são denominações diferentes para o mesmo produto. Duma maneira geral os leites fermentados podem ser classificados de acordo com os microrganismos predominantes, incluindo os seus principais metabolitos, em: leites fermentados por bactérias lácticas mesófilas e termófilas; leites fermentados por leveduras (*kefir*, *kumis*), muito conhecidos na Europa Oriental e Rússia; leites fermentados por bolores, dos quais o *villi* é o mais conhecido e é consumido principalmente na Finlândia (Tamime, 2002). Os produtos lácteos fermentados produzidos a partir de bactérias lácticas mesófilas são mais consumidos nos países do norte da Europa, enquanto os leites fermentados por leveduras são mais consumidos na Rússia, Mongólia e países da Europa Oriental.

A produção dos leites fermentados artesanalmente encontra-se muito difundida na Ásia, África, Médio Oriente, Europa do Norte e Oriental (Savadogo *et al.*, 2004).

Em África, onde as temperaturas são elevadas e não existem condições para conservar o leite em ambiente de refrigeração, a fermentação do leite foi o modo de conservação mais corrente e mais seguro. Estes leites fermentados artesanalmente constituem uma parte importante da dieta das populações africanas e, para além de fornecerem nutrientes, têm a vantagem de se conservarem por longos períodos de tempo devido ao baixo pH e à presença de compostos que inibem o desenvolvimento tanto de microrganismos patogénicos como dos de decomposição

(Bille, 2009). Normalmente as famílias aproveitam os excedentes de leite para a produção de leites fermentados. Estes produtos possuem valor sociocultural e económico, proporcionando alguma renda às populações rurais, especialmente a mulheres e crianças, melhorando desta forma a segurança alimentar das famílias através da geração de empregos (Beukes, Bester & Mostert, 2001).

De acordo com Jespersen (2003) os africanos, em geral, gostam e preferem os produtos lácteos fermentados de modo artesanal. Segundo Wouters, Ayad, Hugenholtz e Smit (2002) a preferência dos africanos pelos leites artesanalmente fermentados prende-se com o “flavour” típico, o qual é conferido por culturas de arranque artesanais. Por outro lado a sabedoria popular, bastante considerada em África, faz referência às suas propriedades, considerando-os alimentos nutritivos, saborosos e de fácil digestão, o que tem sido corroborado por diversos estudos científicos.

Os leites artesanalmente fermentados são considerados promotores de saúde uma vez que têm propriedades terapêuticas e por isso são tradicionalmente utilizados em África para o tratamento de algumas doenças e no desmame saudável das crianças. Estão em vantagem em relação a outros alimentos que podem representar um grande perigo por poderem veicular agentes patogénicos causadores de diarreia em crianças com idade inferior a 5 anos (Beukes *et al.*, 2001; Jamaly, Benjouad & Bouksaim, 2011). Para além disso, vários autores referem a sua utilização na prevenção da hipertensão arterial, do cancro e de diarreias, assim como na redução do colesterol e da intolerância à lactose (Shuangqua, Burentegusi, Yu & Miyamoto, 2006; Akabanda, Owusu-Kwarteng, Glover & Tano-Debrah, 2010).

Os leites naturalmente fermentados possuem uma grande diversidade de microrganismos, de modo que podem ser uma valiosa fonte de bactérias lácticas autóctones para a elaboração de culturas de arranque comerciais, que são utilizadas para a produção de leites fermentados em todo o mundo.

Atualmente, com o grande crescimento do mercado de leites fermentados devido aos grandes benefícios para a saúde humana que lhes são atribuídos, é cada vez maior a procura de estirpes lácticas com características tecnológicas peculiares e capacidade para aumentar o efeito nutricional dos mesmos em benefício da saúde. Os produtos artesanais, devido à sua forma de processamento, particularmente o tipo de recipientes e as condições ambientais, possuem microrganismos específicos que são responsáveis pela riqueza do “flavour”, os quais não podem ser imitados pelas modernas culturas de arranque (Beukes *et al.*, 2001).

À semelhança de muitos países Africanos, as populações pastoris de algumas regiões de Angola, particularmente do Sul, também produzem artesanalmente um leite fermentado com algu-

mas características semelhantes a outros produzidos em África, na Ásia e na América Latina, que toma designações distintas conforme a região. Na província da Huíla, onde o nosso estudo foi realizado, este leite é designado por *omavele*, *mavele* ou *mayne*.

A província da Huíla, com uma área de mais de 166 000 Km², situa-se a Sudoeste de Angola e desenvolve-se desde uma altitude acima de 2.000 m, que vai diminuindo de Norte para Sul e de Oeste para Este. A Noroeste existem montanhas com mais de 2.300 m de altitude que se espraíam por planaltos e planícies imensas, com uma altitude média de 1.100 m (Fig. 1).

Figura 1. Mapa de Angola e Província da Huíla em destaque.



Em termos gerais o clima é tropical, embora nas áreas situadas a maior altitude possa ser considerado temperado, como se verifica nas localidades da Humpata e Tchivinguiro.

A província é uma potência em termos de produção agrícola e pecuária. As maiores concentrações de gado encontram-se nas regiões a Sul e a Oeste, que são de menores altitudes, com fraca pluviosidade (< 750 mm) e grandes amplitudes térmicas (0-39°C), tidas como regiões semiáridas de terras argilosas onde abundam os pastos doces e várias espécies arbustivas, algu-

mas de elevado teor proteico e energético para o gado, sendo por isso, uma região privilegiada para a pecuária (Neto & Almeida, 2006).

As populações destas zonas, na sua maioria do grupo Nhaneca/Humbe, são pastoris e dedicam-se principalmente à criação de gado bovino, caprino e ovino. Vivem em pequenas aldeias familiares “eumbo”, em casas rudimentares construídas com materiais locais. Os currais para o gado bovino localizam-se, geralmente, próximo das habitações.

O gado bovino desta região é do grupo Sanga, inserido nos pseudo-zebus de origem Africana, apresentando-se como predominantes os subtipos “Humbe” e “Mucubal”, já muito misturados devido ao comércio de gado autóctone, frequente na região desde longa data (Gomes, 2013). Este gado é dotado de grande rusticidade, pouco exigente do ponto de vista alimentar e de baixa produtividade. O principal propósito é a produção de leite que constitui um elemento importante da dieta da população. A extração diária do leite para consumo humano pode variar entre as estações do ano atingindo um máximo, cerca de dois litros ou mais por dia na estação chuvosa, enquanto na época seca a produção baixa para cerca de 0,5 a 1 litro ou mais por dia (Gomes, 2013).

Na província da Huíla, mais concretamente na fazenda Jamba que se situa no município do Lubango, produz-se de modo semi-industrial um leite acidificado do tipo do *omavele*, o qual é fabricado com leite de vaca pasteurizado ao qual é adicionado um fermento lácteo comercial designado por “SACCO – SACCO”, importado de Itália. Este leite não tem qualquer semelhança com o *omavele*, quer no que respeita à tecnologia de produção quer à composição microbiológica (Fig. 2).

Figura 2. Leite acidificado *omavele* de produção industrial – Huíla.



Em Angola têm sido comercializados vários tipos de leites fermentados importados, entre os quais se pode destacar o *omavele* ou *omarere* produzido na vizinha República da Namíbia.

Esse leite, produzido à escala semi-industrial ou mesmo industrial, apresenta grandes diferenças tecnológicas e microbiológicas em relação ao *omavele* que foi objeto do nosso estudo (Fig. 3).

Figura 3. Leite fermentado *omaere* ou *omavele* produzido na República da Namíbia.



O principal objetivo do nosso estudo foi o de caracterizar a microbiota láctica presente no *omavele*, o leite artesanalmente fermentado consumido no sul de Angola, para depois se poderem constituir fermentos com microrganismos selecionados e com eles produzir, à escala semi-industrial, leites fermentados. O fermento capaz de produzir o leite fermentado com melhor avaliação sensorial seria escolhido para posterior produção industrial de *omavele*. O segundo objetivo era avaliar a microbiota láctea do *omavele* para podermos aferir a sua qualidade higio-sanitária. Assim, a primeira fase do nosso estudo foi realizada em Angola, onde acompanhámos a produção local do *omavele* e recolhemos as amostras que foram submetidas a análises físico-químicas e microbiológicas para a contagem e isolamento de microrganismos. Na segunda fase os isolados presuntivos de bactérias lácticas e de leveduras foram identificados, através de técnicas de biologia molecular, no laboratório do Centro Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments (CERPTA) da Universidade Autònoma de Barcelona. Na terceira fase do trabalho seleccionámos as estirpes, em função de condições definidas, para serem utilizadas na produção industrial do *omavele*. Na quarta fase produzimos, na oficina tecnológica do CERPTA, leite fermentado à escala semi-industrial com os fermentos constituídos por estirpes de bactérias do ácido láctico (BAL) e de leveduras isoladas do *omavele* artesanal. Na quinta e última fase foi feita a avaliação sensorial do leite fermentado produzido na oficina tecnológica do CERPTA.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Leites fermentados

2.1.1. Definições e generalidades

Os leites fermentados são produzidos a partir de leite inteiro, parcial ou totalmente desnatado, concentrado ou reconstituído, total ou parcialmente com leite magro em pó ou com produtos lácteos pasteurizados ou esterilizados, homogeneizados ou não, e fermentados através do uso de microrganismos específicos, que devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante o prazo de validade (Khurana & Kanawjia, 2007).

O leite naturalmente fermentado apresenta-se como um coágulo branco, com sabor azedo e textura geralmente homogénea, com consistência semifluida a espessa. A composição do leite acidificado varia de acordo com a composição do leite utilizado para o produzir (Narvhus & Gadaga, 2003). Pode ser consumido como uma bebida nutricional refrescante ou utilizado como condimento de alimentos básicos ou ainda como alimento principal. A maioria do leite produzido em várias comunidades rurais africanas é consumido fresco ou fermentado, apenas uma pequena fração do leite produzido entra no setor comercial (Kebede, Viljoen, Gadaga, Narvhus & Lourens-Hattingh, 2007).

A fermentação é uma das formas mais antigas de bioconservação dos alimentos praticada pela humanidade, sendo até hoje o modo de transformação mais utilizado em África para conservar os alimentos, prolongando assim a sua vida útil ou prazo de validade (Savadoغو, Ouattara, Bassole & Traoré, 2006).

Para além desse contributo na conservação dos alimentos, a fermentação tem também um grande impacto sobre a qualidade organolética e nutricional dos mesmos, tornando-os mais fáceis de digerir, aumentando os teores em aminoácidos essenciais, vitaminas e proteínas (Leroy & De Vuyst, 2004). No processo de fermentação as BAL são responsáveis pelas características organoléticas dos produtos fermentados, como resultado da degradação da lactose, da acidificação e da produção de compostos aromáticos.

Estas mudanças físico-químicas induzidas pelas BAL fermentativas exercem grande influência sobre a macroestrutura e as propriedades sensoriais dos produtos lácteos fermentados (Ordoñez *et al.*, 2005; Samet-Bali, Ayadi & Attia, 2012).

Segundo Vlieg e Hugenholtz (2007) a fermentação além de ter uma função importante na preservação dos alimentos, tem uma grande influência na sua qualidade organolética, na medida em que modifica as matérias-primas, transformando-as em produtos com novas propriedades sensoriais. A transformação química dos componentes da matéria-prima e a produção de metabólitos microbianos contribuem para o “flavour” e para o que se designa “sensação de boca”. Nos produtos lácteos, a lactose, o citrato, a gordura e as proteínas são convertidos numa vasta

gama de compostos voláteis e não voláteis responsáveis pelos sabores e aromas agradáveis dos produtos fermentados.

De acordo com Abeer, Abdel e Dardir (2009) a fermentação, atualmente, tem sido utilizada não só para impedir o desenvolvimento de algumas bactérias patogênicas e de decomposição, mas também para melhorar a digestibilidade de produtos lácteos fermentados, uma vez que durante a fermentação ocorre a degradação e inativação de fatores antinutritivos e de toxinas.

2.1.2. Tipos de leites fermentados

Os leites fermentados, quer os artesanais quer os industriais, são produzidos em várias regiões do globo terrestre, especialmente nos países da Europa do Norte e do Mediterrâneo, de África, da Ásia e do Médio Oriente, como se pode observar na Tabela 1.

Tabela 1. Principais leites fermentados consumidos nas diferentes regiões do mundo. Adaptada de Chandan (2013).

Produto	Principal País/região
<i>Acidophilus milk</i>	USA, Rússia
<i>Ayran</i>	Turquia, Azerbaijão, Bulgária, Macedónia, Cazaquistão, Quirguistão
<i>Ayrani</i>	Chipre
<i>Busa</i>	Turquistão
<i>Chal</i>	Turquemenistão
<i>Cieddu</i>	Itália
<i>Cultured buttermilk</i>	USA
<i>Dahi/dudhee/dahee</i>	Índia
<i>Donskaya/varenetes/kurugna/ryzhenka/guslyanka</i>	Rússia
<i>Dough/ abdoogh/mast</i>	Afganistão, Irão
<i>Ergo</i>	Etiópia
<i>Filmjolk/fillbunke/fillbunk/surmelk/taettemjolk/tettemelk</i>	Suécia, Noruega, Escandinávia
<i>Gioddu</i>	Sardenha
<i>Gruzovina</i>	Jugoslávia
<i>Iogurte</i>	Portugal, Brasil
<i>Jugurt/eyran/ayran</i>	Turquia
<i>Katyk</i>	Transcaucásia
<i>Kefir, Koumiss/Kumys</i>	Rússia, Ásia
<i>Kissel maleka/naja/yaourt/urgotnic</i>	Balcãs
<i>Kurunga</i>	Ásia Ocidental
<i>Lassi, Mattha, Ghol, Chhas</i>	Índia, Bangladesh, Paquistão, Nepal
<i>Leben /laban/labani rayeb</i>	Líbano, Síria, Jordânia
<i>Mazun/matzoön/matsun/matsoni/madzoön</i>	Arménia
<i>Mezzoradu</i>	Sicília

Tabela 1. Principais leites fermentados consumidos nas diferentes regiões do mundo. Adaptada de Chandan (2013). (Continuação)

Produto	Principal País/região
<i>Pitkapiima</i>	Finlândia
<i>Roba/rob</i>	Iraque
<i>Shosim/sho/thara</i>	Nepal
<i>Raita India,</i>	Paquistão
<i>Shrikhand</i>	Índia
<i>Skyr</i>	Islândia
<i>Tan/Tahn</i>	Arménia
<i>Tarag</i>	Mongólia
<i>Tarho/taho</i>	Hungria
<i>Viili</i>	Finlândia
<i>Yakult</i>	Japão
<i>Yiaourti</i>	Grécia
<i>Ymer</i>	Dinamarca
<i>Zabady/zabade</i>	Egito, Sudão

Os leites fermentados produzidos em países do Norte da Europa constituem um grupo de produtos diferentes dos produzidos noutros países devido às suas propriedades físicas, caracterizando-se por serem muito viscosos e filamentosos.

Em função da composição microbiana do fermento, os leites fermentados tradicionais classificam-se em leites do tipo I, II, III e IV (Oberman & Libudzisz, 1998).

Os leites fermentados produzidos na Escandinávia, Europa Central e Oriental consideram-se do tipo I, uma vez que os fermentos utilizados na sua produção são compostos por estirpes mesófilas de lactococos (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*) coadjuvados com alguma frequência por estirpes de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e algumas vezes por *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Alguns leites produzidos na Finlândia e Suécia, denominados *viili* (*vilia* ou *filia*) e *langfil*, similares ao *tettemelk*, são exemplo disso. Na produção do *viili* é usado leite não homogeneizado, inoculado com uma cultura composta por estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* produtoras de exopolissacáridos (EPS), por estirpes de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e por bolores como *Geotrichum candidum*, que no seu todo contribuem para realçar o sabor (Oberman & Libudzisz, 1998; Roginski, 2002; Kahala *et al.*, 2008). Durante o processo de produção ocorre a formação de uma camada de gordura, que normalmente se encontra coberta por bolores. É caracterizado por um sabor acre agradável, um aroma agradável a diacetilo e uma textura viscosa ou filamentosa devido à presença de exopolissacáridos,

principalmente produzidos por *Lactococcus* presentes nos fermentos durante a fase de crescimento (Kahala *et al.*, 2008).

Na Suécia produz-se o *filmjolk* ou *kulturmjolk* (*cultured milk*), que é muito popular e semelhante aos anteriores. Este leite caracteriza-se por ter um sabor suave, elevada viscosidade e um aroma intenso típico devido à formação de diacetilo e dióxido de carbono, sendo consumido desde longa data como uma bebida refrescante. O fermento é composto por estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, as duas últimas além de realçarem o sabor e o aroma são produtoras de exopolissacáridos (Roginski, 2002). Há outras variantes deste leite, que são obtidas ao adicionar estirpes probióticas de *Bifidobacterium lactis* e algumas estirpes de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus reuteri*. Uma outra variante é obtida quando se adiciona ao leite uma estirpe de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* L1A, isolada a partir do leite fermentado tradicional *tätte* (Fondén, Leporanta & Svensson, 2006).

Narvhus (2003) faz referência à produção de *tettemelk* ou *tatmjoek*, um leite fermentado tradicional produzido no meio rural da Noruega, que se caracteriza por ser viscoso e ter um aroma e sabor apetecíveis, podendo ser conservado por longos períodos de tempo. Tradicionalmente o *tettemelk* é produzido através da adição ao leite de uma porção do produto anterior ou, na falta daquele, através da adição de folhas da planta carnívora *Pinguicula vulgaris* ao leite ainda não acidificado, estas folhas ajudam a desenvolver a viscosidade. É consumido como um acompanhante de saladas, carnes secas e como sobremesa misturado com marmelada ou açúcar e canela ou misturado com cereais. Considera-se que o *tettemelk* possui propriedades terapêuticas, pelo que é utilizado para tratar alguns problemas de pele, como eczemas, parasitoses e para o tratamento de diarreias.

Segundo Wang *et al.* (2011), em Taiwan consomem-se leites fermentados muito saborosos, com consistência firme e cheiro agradável, semelhantes ao *viili* produzido na Finlândia, cujo fermento é maioritariamente composto por estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e leveduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia fermentans* e *Saccharomyces unisporus*.

Na América do Norte, concretamente nos Estados Unidos da América, os leites fermentados ou *cultured buttermilk* são produzidos com leite desnatado ou semidesnatado pasteurizado, ao qual se adicionam bactérias mesófilas produtoras de ácido láctico, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e bactérias aromatizantes como *Leuconostoc citrovorum* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*. Nos Estados Unidos da América produz-se ainda um outro leite fermentado, o *acidophilus milk*, que é um leite muito

ácido, por vezes amargo, com sabor pouco agradável para o consumidor, mas muito recomendado para pessoas com transtornos digestivos.

Os leites fermentados do tipo II são produzidos com fermentos que apenas contêm estirpes de *Lactobacillus* e são típicos da Bulgária e de algumas regiões do Azerbaijão. O iogurte búlgaro, o *bulgarian milk*, é um exemplo deste tipo de leites. Na sua produção é usado leite de vaca ou de cabra fervido, que é inoculado com uma porção de leite fermentado da produção anterior, após o que é posto a fermentar a uma temperatura próxima dos 45°C. Para a produção industrial deste produto utiliza-se um fermento composto por estirpes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, algumas vezes adicionado de estirpes de *Streptococcus thermophilus* (Oberman & Libudzisz, 1998).

O *yakult*, comercializado no Japão, é preparado com leite desnatado, ao qual se adiciona glucose, extrato de *Chlorella* e estirpes de *Lactobacillus casei* var. *Shirota*. Possui um conteúdo em sólidos totais muito baixo, quando comparado com outros produtos lácteos e tem sido utilizado no tratamento de várias doenças intestinais (Oberman & Libudzisz, 1998).

Os leites fermentados do tipo III são, de uma maneira geral, produzidos maioritariamente por estirpes termófilas, selecionadas a partir da microbiota natural do leite, principalmente *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Entre os leites fermentados produzidos com bactérias lácticas termófilas o mais conhecido é o iogurte, embora existam outros semelhantes produzidos em várias regiões, a nível mundial. O iogurte original é preparado com leite de cabra ou de vaca fervido, arrefecido até à temperatura de 40-45°C e posteriormente inoculado com uma porção de leite previamente acidificado. A temperatura do recipiente que contém o leite inoculado deverá manter-se constante, para tal o recipiente deverá ser completamente envolvido em peles e colocado num forno onde permanecerá cerca de 8 a 10 horas. O iogurte é viscoso, tem consistência firme e é coeso.

Na Islândia produz-se o leite fermentado *skyr*, feito a partir de leite desnatado e pasteurizado a 90-100°C, ao qual se adiciona um fermento composto por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e por lactobacilos mesófilos *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus brevis*. Um outro modo de obter o *skyr* é através da adição de 2% de *skyr* do dia anterior, desde que seja de boa qualidade. Após a fermentação faz-se a remoção do soro por filtração, para se obter um produto mais concentrado. No entanto, existem fermentos comerciais para a produção de *skyr* à escala industrial, os quais são constituídos por outras espécies de bactérias lácticas, tais como: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus casei* (Fondén *et al.*, 2006).

No Mediterrâneo, mais precisamente nos Balcãs, faz-se referência à produção de *mladost*, que é um leite fermentado, produzido a partir de leite inteiro ou desnatado pasteurizado a 85 °C,

ao qual se adiciona um fermento composto por estirpes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. O período de incubação é de 10-14 horas e uma vez atingido 1,5-1,8% de ácido láctico o produto é refrigerado e armazenado à temperatura de 10°C ([www. Monografias.com/trabajos 30/leche-kefir/leche-kefir.shtml](http://www.Monografias.com/trabajos/30/leche-kefir/leche-kefir.shtml)).

Ortu *et al.* (2007) referem o leite fermentado italiano *gioddu*, que é produzido na Sardenha a partir de leite de ovelha ou de cabra e ao qual se adiciona um fermento constituído, predominantemente, por estirpes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

O leite fermentado *zabady*, muito conhecido na Etiópia e em alguns países do Médio Oriente, é tradicionalmente produzido a partir de leite de búfala ou de vaca ou ainda de uma mistura dos dois tipos de leite. No processo de produção do *zabady* o leite é parcialmente desnatado e posteriormente fervido e inoculado com uma porção de *zabady* da produção anterior, a que se segue incubação a 42 °C. *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são as espécies isoladas do *zabady* e com responsabilidade na fermentação do leite (El-Baradei, Delacroix-Buchet & Ogier, 2008).

Na Turquia, o leite fermentado *ayran* é produzido a partir de leite de cabra ou de ovelha e por vezes de leite de vaca. Ao leite é adicionado um fermento composto por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (El-Baradei *et al.*, 2008).

Na Síria produz-se o *labneh* ou *laban*, um leite fermentado tradicional muito popular, com uma textura lisa, suave, barrável, ou seja, com uma consistência que permite o seu espalhamento, com um aroma limpo e um sabor acidificado. É produzido a partir de leite de vaca, ovelha, cabra ou búfala. À escala industrial é produzido com leite pasteurizado ao qual se adiciona um fermento composto por estirpes de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Quando se pretende obter um produto com características definidas utilizam-se, por vezes, estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e diferentes combinações de algumas estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas a partir do *laban rayeb* (Chammas, Saliba, Corrieu & Béal, 2006; Sarkar, 2008).

Rashid, Togo, Ueda e Miyamoto (2007) referem que na Índia e países vizinhos se produzem, de modo artesanal, diferentes tipos de leites fermentados. Estes leites são produzidos a partir de leite de várias espécies de mamíferos (búfalas, vacas e cabras) ou de uma mistura de leite de búfala e de leite de vaca. Na produção do *dahi*, que é semelhante ao iogurte, do *lassi*, do *shrikhand* e do *payodhi*, são usados fermentos contendo estirpes termófilas.

Chandan (2013) refere que a utilização do fermento certo é essencial para a produção de *dahi* de boa qualidade. Uma cultura mista contendo estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* ou espécies de *Leuconostoc* e *Lactococcus lactis*

subsp. *cremoris* na proporção de 1: 1: 1 pode ser utilizada. Além disso, podem ser empregues *Streptococcus thermophilus*, ou uma cultura composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

Desde tempos remotos que o *dahi* é um dos leites fermentados mais consumidos na Índia, sendo produzido a partir de leite pasteurizado ou fervido, fermentado naturalmente ou através da utilização de uma cultura da produção anterior contendo bactérias lácticas e outras bactérias fermentativas. É um produto semissólido, com consistência firme, aroma agradável e um sabor acidificado.

Para a produção de leites fermentados do tipo IV utilizam-se, geralmente, fermentos compostos por uma mistura de diferentes bactérias lácticas, leveduras e por vezes micrococcos e bactérias produtoras de ácido acético como *Acetobacter* (Oberman & Libudzisz, 1998). Neste grupo encontram-se os leites fermentados *kumis* e *kefir*, entre outros.

O *kumis* é um leite fermentado com alguma percentagem de álcool, proveniente do sul da Rússia, da Mongólia, Quirguistão e Sibéria. Tradicionalmente era produzido com leite de égua não pasteurizado e fermentado através da utilização de uma cultura de leveduras e de bactérias lácticas (Wouters *et al.*, 2002; Hao *et al.*, 2010). Atualmente, para a produção industrial do *kumis* utiliza-se leite de vaca, ao qual se adiciona 2,5% de açúcar e 10 a 30% de um fermento constituído por estirpes de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Saccharomyces lactis* (atualmente chama-se *Kluyveromyces lactis*). No entanto, podem ser utilizadas outras bactérias como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus bulgaricus* (atualmente designado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), que têm a função de promover a acidificação do leite, enquanto as leveduras fermentadoras da lactose *Kluyveromyces marxianus* e *Candida kefir* promovem a fermentação alcoólica (Oberman & Libudzisz, 1998; Danova, Petrov, Pavlov & Petrova, 2005).

O *kefir* é outro leite fermentado tradicional, com alguma percentagem de álcool, proveniente da região do Cáucaso. Caracteriza-se por um coalho compacto e uniforme, sabor fresco, ligeiramente ácido e gaseificado, aroma a leveduras e textura cremosa, consumido como uma bebida refrescante (Oberman & Libudzisz, 1998). Quando agitado liberta gás, responsável pela formação de espuma. Para a sua produção utiliza-se leite, que pode ser de cabra, de ovelha ou de vaca, e que é inoculado com grãos de *kefir*. Os grãos de *kefir* contêm uma mistura complexa de microrganismos como *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* e *Candida kefir*. Por vezes encontram-se associados aos grãos de *kefir* alguns lactococos mesófilos homo e heterofermentativos, lactobacilos termófilos, espécies do género *Leuconostoc* e leveduras quer fermentadoras de lactose quer não fermentadoras de lactose.

Dos grãos de *kefir* podem ainda fazer parte *Acetobacter aceti* e *Acetobacter rancens*, que têm como função manter em simbiose os diferentes microrganismos que fazem parte dos referidos grãos e melhorar a consistência dos mesmos, através do aumento da sua viscosidade. Oberman e Libudzisz (1998) e Wouters *et al.* (2002) fazem referência ao leite fermentado produzido na Arménia, o *matzoon*, que tem alguma percentagem de álcool.

No Sudão produz-se o *gariss*, um leite fermentado feito com leite de dromedária. Tradicionalmente o leite é posto a fermentar em dois grandes sacos de couro que são atados à sela de montar do dromedário. O fermento usado é constituído não só por lactobacilos (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus helveticus*) mas também por leveduras pertencentes aos géneros *Candida* e *Kluyveromyces* (Abd El-Salam, 2002).

Nos países do Leste da Europa, particularmente na Rússia, para além dos leites acima referidos existem muitos outros com várias designações. Nuns casos o leite sofre uma fermentação homolática por ação de *Lactobacillus acidophilus*. Noutros casos, o leite pasteurizado misturado com natas é sujeito à ação de um fermento composto por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*.

O *yogurt* é um produto lácteo que, hoje em dia, é mundialmente consumido. É um produto semissólido, obtido a partir da fermentação de leite pasteurizado de vaca ou de outras espécies animais, em que o fermento é constituído por uma mistura simbiótica de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Em alguns países considera-se iogurte o produto resultante não só da ação daquelas bactérias mas também de culturas adjuvantes probióticas como: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus johnsonii* LA1. Para obter uma consistência cremosa o leite de vaca é geralmente enriquecido com leite em pó desnatado, concentrado de proteínas lácteas ou leite desnatado concentrado (Chandan, 2013). Existe uma grande variedade de iogurtes disponíveis no mercado, desde os naturais, os com sabor de frutas, os batidos, os líquidos, os fumados e os congelados (Robison, Tamime & Wszolek, 2002).

2.1.3. Leites artesanalmente fermentados

A fermentação espontânea dos alimentos tem uma longa história em África e no mundo em geral. A produção destes leites baseia-se em conhecimentos adquiridos por transmissão oral pela maioria da população. Os alimentos fermentados têm, em geral, um valor socioeconómico significativo, quer em países em vias de desenvolvimento quer em países desenvolvidos.

Os leites fermentados de produção artesanal, desde longa data tradicionalmente consumidos em muitos países, são muito valorizados devido ao seu sabor, ao seu valor nutritivo e às suas

propriedades terapêuticas (Beukes *et al.*, 2001; Mathara, Schillinger, Kutima, Mbugua & Holzapfel, 2004; Nakasaki, Yanagisawa & Kobayashi, 2008).

Os produtos lácteos produzidos artesanalmente constituem uma parte muito importante da dieta diária das comunidades de alguns países em vias de desenvolvimento, sobretudo do continente Africano e Asiático, do Médio Oriente e da América Latina, constituindo também, uma fonte de rendimentos para as mesmas. A natureza destes produtos difere de uma região para a outra, sendo influenciada pela microbiota autóctone local, que por sua vez reflete as condições climáticas da área e depende do tipo de leite utilizado, do pré-tratamento, das condições de fermentação e do tratamento posterior (Savadoço *et al.*, 2006). Apesar dessa diferença, estes produtos têm em comum a fermentação por bactérias lácticas a que são sujeitos (Abd El Gawad, Abd El Fatah & Al Rubayyi, 2010).

Vários investigadores referem que os leites naturalmente fermentados possuem elevados teores de bactérias lácticas, que são frequentemente utilizados como fermentos na produção industrial de alimentos fermentados, em particular na indústria de lacticínios. Muitas destas bactérias têm capacidade para sintetizar exopolissacáridos que contribuem favoravelmente para a textura e propriedades reológicas dos produtos alimentares, para além de provocarem a sua acidificação, resultante da produção de ácido láctico e ácido acético que são responsáveis pelo sabor e pelo aroma dos produtos (Duboc & Mollet, 2001; Caridi, 2003; Savadoço *et al.*, 2004a).

Existem referências sobre a produção, em África, de vários tipos de leites naturalmente fermentados, como por exemplo o *ergo*. Este leite é produzido na Etiópia e resulta da fermentação natural do leite durante um determinado período de tempo, em que se vai adicionando diariamente quantidades de leite fresco ao já existente no recipiente, até que se atinja a acidez desejável. É um produto de cor branca, viscoso, de textura uniforme, sabor e aroma agradáveis. A partir do *ergo* pode-se fazer a manteiga, o *kibe*, que se conserva por um período de tempo que varia entre 15 e 20 dias (Gonfa, Foster & Holzapfel, 2001; Assefa, Beyene & Santhanam, 2008).

A população de pastores do sul da Etiópia, mais precisamente da região de Borena, consome tradicionalmente um leite fermentado denominado *ititu*, que se caracteriza por ter um sabor próprio a leite fumado, e isto porque fermenta num recipiente (*gorfa* ou *amuyou*) previamente defumado com o fumo resultante da combustão de uma planta denominada *Acacia nilotica* (Food and Agriculture Organization of United Nations [FAO]1990; Assefa *et al.*, 2008).

A preparação do *ititu* é em tudo semelhante à do leite fermentado naturalmente *ergo*, exceto no que diz respeito ao período de fermentação, que no *ititu* é mais longo, são cerca de 14 dias. Durante este período vai-se retirando o soro e adicionando leite fresco. O *ititu* é um produto de cor branca, mais consistente que o *ergo*, muito semelhante a um queijo branco tradicional, cujo sabor e cheiro são do agrado dos consumidores locais (FAO,1990; Gonfa *et al.*, 2001; Ashenafi, 2006).

Algumas tribos do Quênia, como os Massai, os Turkana, os Kalenjins, os Somalis e os Meru produzem de modo tradicional um leite fermentado denominado *iria ri mattii*, para o que utilizam cabaças, que mais não são do que recipientes feitos a partir do fruto de plantas da família das *Cucurbitaceae*, que neste caso é a *Lagenaria leucantha*. Este fruto depois de seco é esvaziado do seu conteúdo e o seu interior é raspado com os talos de uma planta, o *mutero* (*Olea africana*), para se obter uma superfície uniforme e lisa. Em seguida o interior da cabaça é defumado com o fumo resultante da combustão do *mutero* (Kimonye & Robinson, 1991). No Quênia é também produzido o *maziwa lala*, que significa leite dormido ou *maziwa mgando* leite azedo coagulado, que também é produzido na vizinha Tanzânia. Neste caso, quer se utilize leite cru ou leite aquecido, recorre-se à filtração para uma panela de barro ou para uma cabaça defumada ou não, que é colocada num local quente durante 1 a 5 dias. Diariamente são adicionadas quantidades de leite fresco ao leite já existente nos recipientes, retirando-se por vezes o soro, para aumentar os sólidos totais e/ou a viscosidade, antes do completo enchimento da cabaça. O *mala* é um produto comercial semelhante ao *maziwa lala*, processado industrialmente a partir de culturas de arranque mesófilas (Miyamoto, Gichuru, Akimoto & Nakae, 1989).

No sul do Quênia e norte da Tanzânia as comunidades Massai produzem o leite fermentado tradicional *kule naoto*, tido como um alimento indispensável para aquela comunidade, que raramente consome cereais. Este leite fermentado é o resultado da fermentação espontânea do leite de zebu ou de vaca, pasteurizado ou não, adicionado de sangue fresco, colocado numa cabaça obtida a partir do fruto da *Lagenaria siceraria*, previamente defumada com ramos e folhas de *Eucalyptus* ou de *Euclea divinorum*, em que o período de fermentação é de aproximadamente cinco dias. O produto tem uma consistência similar à do iogurte comercial ou queijo fresco e tem um sabor agradável (Mathara *et al.*, 2004; Mathara *et al.*, 2008)

Na África do Sul os leites fermentados tradicionais dão pelos nomes de *maas*, *amasi*, *inkomasi* e *sethemi*. Resultam da fermentação do leite à temperatura ambiente (25-30°C) durante 2 a 3 dias, em cabaças ou panelas de barro que já tenham sido utilizadas. Após o leite ter coagulado retira-se o soro e volta-se a colocar mais leite no recipiente. À medida que se vai removendo o soro obtêm-se um produto viscoso e mais consistente do que o iogurte normal. O leite fermentado *amasi* produzido na África do Sul e no Lesotho é frequentemente consumido com papa de milho como refeição principal ou com sorgo entre as refeições (Gadaga, Mutukumira, Narvhus & Feresu, 1999; Gadaga, Mutukumira & Narvhus, 2000; Todorov, Nyati, Meincken & Dicks, 2007). Duma maneira geral, neste tipo de produtos, é comum ocorrer uma fermentação mista entre bactérias homo e heterofermentativas tais como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e leveduras (FAO, 1990; Beukes *et al.*, 2001; Bille, 2009).

O leite fermentado designado por *mafi* é produzido não só no Lesotho mas também na África do Sul pelos Sotho, sendo preparado em panelas de barro de modo semelhante ao *amasi* (Beukes *et al.*, 2001). O soro do leite é, normalmente, retirado da coalhada do leite e é utilizado como condimento ou consumido acompanhado de sorgo grosso ou papa de farinha de milho (Gadaga, Lehohla & Ntuli, 2013).

O *mafi* é semelhante ao leite fermentado tradicional produzido no Botsuana, o *madila*. Para a sua produção o leite fresco é filtrado, através de um coador, para um balde de esmalte/metal que é mantido num lugar quente (± 30 °C) durante 24 horas, para iniciar a fermentação. Durante 7 a 8 dias vai-se adicionando, diariamente, leite azedo ao leite fermentado contido num saco, e durante esse período de tempo o leite vai fermentando. O saco é, então, pendurado numa viga por três ou quatro dias, durante os quais o soro se vai escoando. Antes do consumo ou venda o *madila* é removido do saco e misturado com leite fresco numa proporção de 4:1 (Ohiokpehai & Jagow, 1998).

No Zimbabwe os leites naturalmente fermentados são denominados *hodzeko*, *amasi* ou *mukaka wakakora*. Resultam da fermentação espontânea de leite de vaca não pasteurizado, em panelas de barro ou de alumínio ou em cabaças, durante dois a três dias à temperatura ambiente. Algumas vezes uma pequena quantidade de *amasi* é adicionada ao leite fresco para acelerar o processo de fermentação (Gadaga *et al.*, 2000; Todorov *et al.*, 2007). Estes leites apresentam uma consistência ligeiramente mais espessa do que o iogurte, um sabor suave e um aroma agradável devido ao ácido láctico e a compostos voláteis produzidos pela mistura de microrganismos. O produto depois de agitado apresenta uma consistência líquida e é frequentemente consumido com a tradicional papa de milho *sadza* ou misturado com outros cereais (Ferusu & Muzondo, 1990; Gadaga *et al.*, 2000).

Em Marrocos, na Tunísia e no Líbano é muito popular o leite fermentado tradicional que dá pelos nomes de *leben* ou *lben*, consoante o país. Tradicionalmente, para a produção do *lben* e de outros leites fermentados semelhantes, o leite fermenta espontaneamente (sem a adição de fermento) à temperatura ambiente até que ocorra a sua coagulação, o que pode acontecer em 24 a 72 horas (Benkerroum & Tamime, 2004; Samet-Bali *et al.*, 2012) ou através da inoculação de uma porção da produção anterior que contém bactérias lácticas e outras bactérias fermentativas em leite semidesnatado, para tornar o processo de fermentação mais expedito. Conserva-se bem por um período de três dias à temperatura de 4°C. Quando batido pode ser transformado em manteiga (Ouadghiri *et al.*, 2009).

Na Nigéria e no Gana os grupos étnicos Hausa e Fulani produzem um leite naturalmente fermentado denominado *nono* ou *nunu*, em função da tribo. O leite fresco não pasteurizado é colocado num recipiente, que pode ser ou uma cabaça ou uma panela de barro ou um balde de

plástico, e fica a incubar durante dois a três dias. Durante este período ocorre a libertação de uma grande quantidade de soro, havendo por isso a necessidade de agitar o recipiente para que o produto final tenha uma consistência uniforme. O *nono* ou *nunu* tem um sabor semelhante ao do iogurte e pode ser consumido ao natural ou com açúcar (Bankole & Okagbue, 1992; Iwuoha & Eke, 1996; Akabanda *et al.*, 2010; Okonkwo, 2011).

Obodai e Dodd (2006) referem que no Gana é produzido o leite fermentado *nyarmie*, que à semelhança de tantos outros também resulta da fermentação espontânea do leite que foi pasteurizado à temperatura de 65-75 °C, durante 30-45 minutos.

Segundo Ogbonna, David, Waba e Eze (2012) na Nigéria existem ainda duas variantes do *nono*, uma é o *kesham* (um *nono* aguado) e a outra é o *kindrimo* (um *nono* semissólido), assim designados na língua local da tribo Fulani. O leite destinado à sua produção é submetido a fervura durante 20 minutos, depois é transferido para uma cabaça ou outro recipiente onde ocorre a fermentação durante 12-24 horas. Quando necessário adiciona-se ao leite morno ou frio uma porção da produção anterior.

No Mali produz-se o leite fermentado *kadam*, que é uma bebida tradicional refrescante muito consumida no verão. Durante a sua produção há acumulação residual do leite à medida que vai acidificando. Dependendo da estação do ano a acidificação pode levar horas ou vários dias (FAO, 1990).

Wullschleger *et al.* (2013) referem a produção do *fené* no Mali, um leite fermentado feito a partir de leite cru aquecido a uma temperatura superior à da pasteurização, em que a fermentação é espontânea e ocorre à temperatura ambiente. O *fené* tem uma textura cremosa e um sabor levemente azedo semelhante ao do iogurte. Num bom *fené* estes atributos são os mais apreciados pelos consumidores.

O leite fermentado *rayeb*, muito popular no meio rural do Egito, é feito tradicionalmente com leite de búfala, em que a fermentação é espontânea. A sua produção é semelhante à de outros leites fermentados, em que há a intervenção de BAL e de outros microrganismos (Abd El Gawad *et al.*, 2010).

No Uganda produzem-se os leites fermentados *chekapmkaika* e *kwerionik*. Estes leites são produzidos, principalmente, pelas tribos pastoris, incluindo os Bahima que habitam a zona ocidental do Uganda. Nesta zona do Uganda utiliza-se mais o leite de zebu do que na zona oriental, onde é mais utilizado o leite de vacas da raça “Ankole-Watusi”. A cabaça usada para a fermentação é defumada. O *kwerionik* é produzido de forma tradicional, em que o leite cru é introduzido numa cabaça defumada e deixado a fermentar à temperatura ambiente durante 3 a 7 dias, sendo consumido durante este período. Quando este leite permanece em fermentação por um período de 28 dias passa a denominar-se por *katanik*; se o período de

fermentação é superior a 29 dias, que se pode prolongar por um ano, então passa a denominar-se *chekapmkaika*. Durante este período vai-se removendo o soro e adicionando leite fresco ou fervido de dois em dois dias ou uma vez por semana, o que está dependente da temperatura ambiente. Para melhorar qualidade do *chekapmkaika* durante o armazenamento é conveniente remover, antes da adição de leite, a camada superficial que é suscetível de conter fungos (Schutte, 2013).

Em algumas áreas rurais do Sudão produz-se de modo tradicional um leite fermentado muito popular denominado *rob* ou *roub*, em que o leite é inoculado com uma porção da produção anterior, que contém bactérias lácticas e outras bactérias fermentativas. Normalmente utiliza-se o leite de vaca e/ou de ovelha e de cabra (Abdelgadir, Ahmed & Dirar, 1998). O recipiente utilizado para a fermentação do leite pode ser um saco feito com pele de cabra ou então uma cabaça (*bukhssa*). No entanto, os mesmos autores referem que para a produção de *roub* com um bom “flavour” o leite é fermentado num recipiente denominado *dayyara* e batido num outro denominado *khashash*. Quando fresco e com um pH de 4,5 tem um sabor agradável, sendo nesta altura consumido como uma bebida refrescante (Abdelgadir *et al.*, 1998; Abdelgadir, Hamad, Moller & Jakobsen, 2001). No Sudão produz-se um outro leite fermentado o *mish*, que é um produto caseiro tradicional obtido através da adição de uma pequena quantidade de soro do leite *laben-rayeb* ou do *mish* ao leite previamente aquecido, ao qual se adicionam especiarias ao 2º ou 3º dia de fermentação, momento em que está pronto para o consumo (Abdalla & Ahmed, 2010). A intensidade das especiarias varia de região para região, de família para família na mesma área, da disponibilidade das especiarias e do gosto da população (El-Mardi, 1988 citado por El-Zubeir *et al.*, 2005). O *mish* é, normalmente, consumido como um queijo fresco ou em saladas, acompanhado de pão branco.

No Egito, o leite fermentado tradicional *laban rayeb* é produzido artesanalmente, principalmente, por mulheres. Na sua produção é usado o leite de búfala que é colocado em panelas de barro previamente higienizadas e secas num forno. Essas panelas, onde ocorre a fermentação do leite, são colocadas num local quente até ao dia seguinte. A fermentação ocorre por ação da microbiota natural, que é composta por bactérias lácticas e outros microrganismos fermentadores. A gordura superficial é, normalmente, removida para se produzir manteiga. O *laban rayeb* é também utilizado para o fabrico de queijo ou então para acompanhar saladas (Abd El-Salam, 2002).

Saleh (2013) faz referência ao leite fermentado tradicional *laban zeer*, muito popular no Alto Egito. É produzido a partir de leite de búfala, e às vezes de vaca, cabra, ovelha ou uma mistura de ambos. O leite é colocado num recipiente de couro de cabra curtido designado *kerbah*, que contém uma certa quantidade de resíduos de leite fermentado do lote anterior, o qual funciona

como cultura de arranque. Posteriormente o leite é deixado a fermentar espontaneamente à temperatura ambiente, por períodos de tempo que são determinados pela experiência de quem o produz, o que por sua vez depende da temperatura ambiente. Em seguida é armazenado numa ânfora de barro, o *zeer*. Durante o armazenamento parte do soro vai-se evaporando através das paredes porosas do recipiente, dando lugar a um produto mais concentrado. Após cada adição de um novo lote de soro de leite azedo, é adicionado sal ao conteúdo de cada *zeer*. O *laban zeer* possui um sabor amargo e um aroma específico devido à presença de um teor elevado de bactérias lácticas e de leveduras, o que está associado a baixos valores de pH (3,9) e à adição de sal.

De acordo com El-Gendy (1983) e Saleh (2013) o *laban zeer* é utilizado para o fabrico de *kishk* (feito de *laban zeer* e de grãos de trigo cozidos, secos e triturados) e por vezes é também utilizado em saladas ou como bebida depois de diluído com água, adquirindo uma consistência semissólida, sabor ácido e salgado.

Na Guiné-Bissau é produzido de modo artesanal um leite fermentado, popularmente conhecido por *leite dormido*, feito a partir de leite de vaca (Bernardo, Brandão & Mendes, 1994).

O leite fermentado *dahi* é produzido na Índia, principalmente nos estados do Punjab e Haryana, e nos países limítrofes. O *dahi* é transformado numa bebida refrescante após agitação e adição de uma pequena quantidade de água, passando a denominar-se *lassi*, que é consumido preferencialmente fresco com sal ou açúcar (FAO, 1990). No Bangladesh o *dahi* é feito com leite de vaca ou de búfala ou com a mistura de ambos, em que se utiliza uma cultura anterior mas de identidade desconhecida. Duma maneira geral é consumido como sobremesa depois das refeições principais. Acredita-se que o *dahi* é altamente nutritivo e contribui para a melhoria da digestão e cura de distúrbios digestivos (Rashid *et al.*, 2007). Na região dos Himalaias, no Nepal e no Butão consome-se o *mahi*, que é habitualmente conhecido como uma bebida tradicional do Nepal. O *mahi*, produzido a partir do *dahi*, é feito com leite fermentado concentrado ou desnatado adicionado de culturas naturais ou culturas lácticas de produção industrial. No Nepal o *mahi* é consumido como bebida ou ainda como alimento principal (FAO, 1990).

Na costa caribenha da Colômbia produz-se o *suero costeno*, um leite fermentado caseiro, resultante da fermentação espontânea do leite de vaca colocado numa cabaça (fruto seco de *Lagenaria vulgaris*). Durante a fermentação ocorre a libertação de uma grande quantidade de lactosoro (fase líquida), havendo por isso a necessidade de agitar o recipiente para que o produto final tenha uma consistência uniforme e uma textura cremosa. O período de fermentação, necessário para a obtenção deste produto, varia de 1 a 3 dias em função da viscosidade desejada (Cueto, Garcia, Garcés & Cruz, 2007).

2.2. Produção de leites artesanalmente fermentados em África

2.2.1. Modo de produção

Existem em África diferentes técnicas locais de transformação, que vão desde a simples coagulação do leite para consumo imediato ao queijo seco, que se pode conservar por muito tempo (Gret, 1994).

Os leites artesanalmente fermentados são o resultado duma fermentação espontânea (sem adição de fermento) e não controlada dos componentes do leite cru, em conjunto com os microrganismos oriundos do processo de ordenha, da alimentação, dos utensílios e do meio ambiente, em que se produzem metabolitos que provocam alterações específicas no leite, ou ainda, podem resultar da adição de uma porção do leite da produção anterior (back-sloping), geralmente de identidade microbiana desconhecida (Wouters *et al.*, 2002). Esta técnica (back-sloping) é usada com sucesso há milhares de anos para perpetuar a fermentação e promover uma rápida produção de ácido láctico (Narvhus e Gadaga, 2003; Bille, 2009). Segundo Mathara *et al.* (2004) a produção destes leites é frequente no meio rural, a nível familiar ou de pequenas empresas.

A produção deste tipo de leites fermentados consiste em colocar o leite cru num recipiente (cabaça, balde de plástico, panela de barro, painelas de esmalte, sacos de pele, e outros) previamente defumado ou não, coberto com uma tampa, ao qual pode ou não ser adicionada uma porção de leite fermentado da produção anterior, que atua como fermento. Na maior parte dos casos os restos de leite fermentado que ficam no recipiente contêm bactérias que servem de fermento.

Posteriormente o recipiente é colocado num local arejado e geralmente coberto, para o proteger do pó, por um período que vai desde algumas horas a alguns dias. O tempo de coagulação varia muito em função da temperatura do local, que por sua vez varia em função do clima da região (FAO, 1990; Gret, 1994). No entanto, fatores como elevados teores microbianos e a falta de meios de refrigeração fazem com que o leite acidifique e coagule entre 12 e 24 horas ou menos. Durante este período há produção de ácido láctico e descida do pH, responsável pela precipitação ácida da caseína e pelo aumento da consistência, o que contribui para a conservação e estabilidade do produto. É por isso que o leite fermentado pode ser armazenado por mais tempo que o leite fresco, sem que se altere (Narvhus, 2003).

As tecnologias de produção têm evoluído dentro das diferentes comunidades, resultando na produção de produtos com variados sabores, cores, texturas, consistências e características típicas de cada região (FAO, 1990).

As principais diferenças na produção destes leites artesanalmente fermentados residem: a) no tipo de leite utilizado (vaca, ovelha, cabra, dromedária, búfala ou vaca de raça Zebu)

e por vezes nas misturas de leite que se fazem, como por exemplo a mistura do leite de vaca com leite de cabra e/ou de ovelha e de vaca de raça Zebu, ou de leite de vaca com leite de dromedária como acontece na Somália, Maurítânia e nalgumas regiões do Quênia; b) no período de incubação, que pode variar entre algumas horas e aproximadamente 20 dias; c) no tratamento térmico a que o leite é submetido; d) no tipo de recipiente (sacos, cabaças, panelas de barro, jarros de ferro e cestos) que varia de acordo com a região, em que nalguns casos são submetidos a um processo de higienização através do fumo resultante da queima de uma grande variedade de plantas, ervas, leguminosas e madeiras duras como a de *Olea africana* ou a de *Acopia busia*, para evitar o crescimento de bolores e leveduras; e) na adição ou não de algumas plantas (raízes ou cascas), folhas e/ou extratos vegetais para corar e melhorar o sabor e o aroma, como por exemplo o pó de carvão de uma árvore, que no Quênia é utilizado para melhorar o sabor e as folhas frescas de *Ruta chalepensis*, que na Etiópia são utilizadas com o objetivo de melhorar o sabor e o aroma (FAO, 1990; Gret, 1994).

A defumação tem a vantagem de conferir sabores e aromas especiais aos produtos e de higienizar os recipientes, devido à atividade antimicrobiana do fumo, que reduz a possibilidade de alteração do produto e prolonga o seu prazo de validade à temperatura ambiente. Estudos realizados na Etiópia revelaram que a defumação, para além de impedir o desenvolvimento de microrganismos patogénicos, também retarda o processo fermentativo em si (FAO, 1990; Ashenafi, 1996).

2.2.2. Recipientes

Os recipientes mais utilizados pelas populações, em particular do meio rural, para a produção de leites artesanalmente fermentados são muito simples e fabricados por eles próprios a partir de recursos locais. Geralmente utilizam-se sacos feitos de pele de animais, cabaças, panelas de barro e de madeira, jarros de ferro, cestos, bambu fresco, bacias, funis de madeira, entre outros (Ferusu & Muzondo, 1990; FAO, 1990; Beukes *et al.*, 2001; Savadogo *et al.*, 2004; Kebede *et al.*, 2007; Akabanda *et al.*, 2010). A utilização destes utensílios varia de região para região e de acordo com a tradição de cada povo. Os recipientes mais utilizados na Etiópia, Quênia, Sudão, Egito e Namíbia, são as cabaças, panelas de barro e madeira. Na África do Sul utilizam-se com maior frequência as panelas de barro, os jarros de ferro, os cestos, os sacos do leite (*milk-sacks*) e por último as cabaças (Kebede *et al.*, 2007). No entanto, segundo Gadaga *et al.* (2013) no Lesotho os potes de cerâmica já não são muito usados como recipientes de fermentação. Aqueles estão a ser substituídos por recipientes de plástico ou de metal. O recipiente tem grande influência sobre a qualidade do produto fermentado.

O tipo de recipiente e as condições ambientais contribuem para a seleção gradual de microrganismos específicos, que são responsáveis pelo sabor agradável e especial, que não é passível de imitação com os modernos fermentos selecionados (Beukes *et al.*, 2001). Segundo estes autores, o grupo étnico Sotho da África do Sul tem maior preferência pela panela de barro do que pela cabaça para a produção do leite fermentado *amasi*, porque a panela de barro confere melhor sabor e aroma.

O grau de higienização dos recipientes utilizados para a fermentação do leite varia de acordo com os hábitos de higiene das comunidades de cada região. Segundo os relatos de alguns produtores, em alguns casos os recipientes são lavados com ervas específicas, noutros casos são lavados esporadicamente e apenas com água fria ou morna e areia.

No Uganda, os recipientes de madeira usados para a fermentação do leite são lavados com urina de bovino. Contudo, há casos em que os recipientes são difíceis de lavar, como as bolsas de pele ou as cabaças, o que proporciona uma microbiota residente. Em muitos países africanos os recipientes são higienizados com o fumo obtido da queima de plantas específicas (FAO, 1990).

2.3. Microbiologia dos leites fermentados

Os microrganismos presentes em leites naturalmente fermentados têm origem, geralmente, no próprio animal, nos equipamentos ou nos utensílios utilizados, no meio ambiente, na água, nos recipientes de armazenamento, no pessoal, ou ainda, no leite fermentado da produção anterior quando este é utilizado (Franz, Stiles, Schleifer & Holzapfel, 2003; Giraffa, 2003). O leite cru utilizado na produção da grande maioria dos leites artesanalmente fermentados possui uma microbiota abundante e complexa, incluindo bactérias patogénicas e de decomposição. No entanto, as condições ambientais como a temperatura e a origem do leite, as condições de processamento e as condições sanitárias, podem influenciar de forma significativa a composição microbiana de produtos lácteos fabricados de modo tradicional.

Duma maneira geral a microbiota láctica é composta por bactérias mesófilas, incluindo o grupo de bactérias produtoras de ácido láctico ou BAL (Beukes *et al.*, 2001; Mathara *et al.*, 2004), embora bolores, leveduras, micrococos, pediococos e corineformes possam, de igual forma, desempenhar um papel importante (Wouters *et al.*, 2002; Zamfir *et al.*, 2006).

Na maioria dos estudos realizados em leites fermentados tradicionais, as bactérias produtoras de ácido láctico mais frequentemente identificadas pertencem aos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus* conforme se pode constatar na Tabela 2.

Os produtos lácteos fermentados oferecem um nicho ecológico especial para o desenvolvimento de leveduras específicas. Estas representam uma parte importante da microbiota de muitos

leites fermentados, como por exemplo, o *kefir*, o *laban* e o *kumis*. As leveduras crescem e multiplicam-se em conjunto com as BAL e desempenham um papel ativo, na medida em que são responsáveis por sabores e aromas característicos dos produtos fermentados e pela produção de gás (El-Sharoud, Belloch, Peris & Querol, 2009).

No processo de fermentação, as leveduras proporcionam aminoácidos, vitaminas e outros compostos necessários ao crescimento das bactérias fermentadoras da lactose, do que resulta aumento da produção de ácido láctico, enquanto os produtos finais do metabolismo bacteriano vão sendo utilizados pelas leveduras como uma fonte de energia, criando deste modo um equilíbrio ou uma estabilidade no produto (Viljoen, 2001; Narvhus & Gadaga, 2003).

De acordo com Vasdinyei e Deák (2003) o desenvolvimento atípico de algumas espécies de leveduras, presentes em determinados produtos lácteos, pode ser responsável pela decomposição dos mesmos. Os defeitos mais comuns causados pelas leveduras são: produção de gás, sabor e cheiro a leveduras e outros maus cheiros e sabores, alterações de cor e textura.

É frequente encontrarem-se elevadas concentrações de leveduras no ambiente e nos equipamentos utilizados no processamento de produtos lácteos, o que é devido a contaminação por falta de cuidados de higiene (Viljoen, 2001).

Tabela 2. Bactérias lácticas isoladas de produtos lácteos fermentados em África. Adaptada de Narvhus & Gadaga (2003).

Espécies	Número de estirpes				
	Beyene, 1994	Mutukumira <i>et al.</i> , 1995	Abdelgadir <i>et al.</i> , 2001 ^a	Beukes <i>et al.</i> , 2001	Sserunjogi, 1999
LACTOBACILLUS	113				
<i>acidophilus</i>	0	1	8,5%		0
<i>biofermentans</i>	2	0			0
<i>brevis</i>	6	0			0
<i>casei</i> subsp. <i>casei</i>	5	1			0
<i>casei</i> subsp. <i>pseudopiantarum</i>	3	0			0
<i>curvatus</i>	13	0			0
<i>fermentum</i>	0	0	34,5%		0
<i>helveticus</i>	0	0			4
<i>plantarum</i>	14	2			43
<i>vaccinostercus</i>	4	0			0
LACTOCOCCUS					
<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	29	3	26,4%	103	5
<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	6	0			0
<i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	3	2			1
<i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	8	0			0

Tabela 2. Bactérias lácticas isoladas de produtos lácteos fermentados em África. Adaptada de Narvhus & Gadaga (2003). (Continuação)

Espécies	Número de estirpes				
	Beyene, 1994	Mutukumira <i>et al.</i> , 1995	Abdelgadir <i>et al.</i> , 2001 ^a	Beukes <i>et al.</i> , 2001	Sserunjogi, 1999
LEUCONOSTOC				130	
<i>citreum</i>	0	0			0
<i>lactis</i>	9	0			4
mesenteroides subsp. mesenteroides	17	2			9
<i>mesenteroides subsp. cremoris</i>	7	0			0
mesenteroides subsp. dextranicum	4	0			0
STREPTOCOCCUS				13	
<i>salivarius</i>			30%		
ENTEROCOCCUS				7	
<i>faecium</i>		2			

2.3.1. Características gerais das bactérias produtoras de ácido láctico

2.3.1.1. Taxonomia e morfologia

Historicamente, com base na classificação de Orla-Jessen (1919), os géneros de bactérias produtoras do ácido láctico ou bactérias lácticas ou BAL mais importantes são: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. No entanto, as revisões taxonómicas sugerem 16 novos géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Axelsson, 1998). Contudo, as BAL mais comuns em fermentos pertencem aos géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* e *Pediococcus*.

Estes microrganismos constituem um grupo heterogéneo, embora tenham em comum algumas características como o serem Gram positivos, catalase negativos, não esporulados, imóveis, oxidase negativos e geralmente nitrato-redutase negativos; são microaerófilos ou anaeróbios aerotolerantes, desenvolvendo-se bem à superfície de meios sólidos quando em anaerobiose ou em ambiente com baixa tensão de oxigénio; como são ácido-tolerantes multiplicam-se a valores de pH entre 4,0 e 4,5, e há estirpes que podem tolerar e desenvolver-se a um pH acima de 9,0 e abaixo de 3,2, sobrevivem naturalmente em meios onde outras bactérias não suportariam a ação dos ácidos orgânicos. As bactérias produtoras do ácido láctico não são formadoras de esporos e são imóveis (Claesson, van Sinderen & O' Toole, 2007).

A concentração molar de guanina+citosina (G+C) do ADN é geralmente inferior a 54 %. A formação de ATP na célula microbiana pode ocorrer através de dois mecanismos diferentes – a fosforilação a nível do substrato e a acoplada ao transporte de eletrões na cadeia citocrómica.

Não possuem citocromos, que são proteínas com grupo prostético porfirínico contendo ferro, por isso não sintetizam o ATP por esta via (Hassan & Frank, 2001; Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth & Schillinger, 2001; Limsowtin, Broome & Powell, 2002). Sintetizam o ATP a partir de hidratos de carbono por fosforilação a nível do substrato. São quimiorganotróficos e apenas se desenvolvem em meios de cultura complexos, para o que necessitam de aminoácidos pré-formados, de bases púricas e pirimídicas, e de vitaminas do grupo B (Caplice & Fitzgerald, 1999). Apresentam a forma de cocos ou bastonetes e têm fraca atividade proteolítica e lipolítica. Em relação à temperatura de crescimento podem classificar-se em mesófilas e termófilas. Na sua maioria são bactérias mesófilas, mas algumas podem desenvolver-se a temperaturas inferiores a 5°C e superiores a 45°C (Caplice & Fitzgerald, 1999; Amenu, 2013).

Encontram-se amplamente distribuídos em diferentes ecossistemas, sendo frequentes em alimentos ricos em nutrientes contendo açúcares simples ou aminoácidos, vitaminas e com baixa tensão de oxigénio, como os produtos lácteos, carnes, farinhas, vegetais fermentados, pão, silagem, bebidas, assim como em águas residuais, plantas, trato intestinal, aparelho genital e respiratório do Homem e animais, e ainda na microbiota normal do canal da glândula mamária (López-Díaz, Alonso, Román, Garcia-López & Moreno, 2000; Hassan & Frank, 2001; Coeuret, Dubernet, Bernardeau, Guéguen & Vernoux, 2003; Savadogo *et al.*, 2006).

2.3.1.2. *Lactobacillus*

É um dos maiores grupos da família Lactobacillaceae, é um género muito heterogéneo, como é atestado pelo conteúdo de G+C do ADN das diferentes espécies, o qual varia entre 33 e 55 mol% e normalmente é inferior a 50 mol% (Tannock, 2004; Bernardeau, Vernoux, Henri-Dubernet & Guéguen, 2008).

Lactobacillus são microrganismos em forma de bacilos ou de cocobacilos frequentemente em cadeia, estritamente fermentativos, aerotolerantes ou anaeróbios, acidúricos ou acidófilos. Têm exigências nutricionais complexas, como aminoácidos, derivados dos ácidos nucleicos, péptidos, vitaminas, sais minerais, ácidos gordos ou ésteres de ácidos gordos e hidratos de carbono fermentescíveis (Giraffa, Chanishvili & Widyastuti, 2010). É um dos grupos de BAL mais importantes, assumindo um papel de destaque na produção de alimentos fermentados, em particular dos produtos lácteos fermentados, devido à ação conservante resultante da acidificação e/ou ao realce do “flavour”, textura e nutrição (Giraffa *et al.*, 2010). Atualmente têm sido alvo de grande interesse na área dos probióticos (Tannock, 2004; Claesson *et al.*, 2007).

As suas exigências nutricionais estão refletidas nos seus habitat, que são substratos ricos em hidratos de carbono: vegetais, alimentos fermentados ou alterados, ou em associação com organismos animais. Crescem em condições de anaerobiose ou com reduzida tensão de oxigénio

em todos os habitat capazes de fornecer hidratos de carbono, produtos de degradação proteica, ácidos nucleicos e vitaminas, de modo que podem ser encontrados numa grande variedade de nichos ecológicos, como plantas, mucosas dos seres humanos e de animais (cavidade oral, intestino e aparelho reprodutor feminino), no leite cru, esterco e em habitat artificiais como esgotos e alimentos em fase decomposição (Ortu *et al.*, 2007; Giraffa *et al.*, 2010).

De acordo com as características fermentativas podem ser divididos em 3 grupos:

Grupo I – é constituído por *Lactobacillus* homofermentativos obrigatórios (*Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii*, e outros) que se caracterizam pela capacidade de fermentar hexoses, quase exclusivamente, em ácido láctico pela via de Embden-Meyerhof-Parnas. Contêm aldolase, mas não fosfocetolase e conseqüentemente não podem fermentar pentoses ou gluconato, fermentam apenas as hexoses exclusivamente pela via glicolítica (homofermentativa). Este grupo inclui todos os lactobacilos termófilos encontrados em culturas de arranque para a produção de queijo, iogurte e probióticos.

Grupo II – é constituído por *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, e outros), que fermentam as hexoses quase exclusivamente em ácido láctico pela via de Embden-Meyerhof-Parnas ou fermentam as pentoses em ácido láctico e ácido acético via uma fosfocetolase, que é induzida pelas pentoses. São mesófilas, com exceção de algumas espécies. Encontram-se, sobretudo em vegetais e carnes fermentadas.

Grupo III – é constituído por *Lactobacillus* heterofermentativos obrigatórios (*Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. reuteri*, e outros) que fermentam as hexoses em ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂; fermentam as pentoses em ácido láctico e ácido acético. Em ambas as vias há, geralmente, envolvimento da fosfocetolase. Produzem substâncias voláteis aromáticas. Devido ao seu fraco poder acidificante estas espécies podem desenvolver-se em associação com outras BAL ou outros microrganismos em produtos alimentares fermentados (Stiles & Holzapfel, 1997; Jay, 2000; Limsowtin *et al.*, 2002; Curry & Crow, 2002).

2.3.1.3. *Lactococcus*

O género *Lactococcus* inclui cinco espécies, *Lc. garvieae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffi-nolactis* e *Lc. lactis*, este com as subespécies *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *hordniae* e *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. A espécie mais utilizada em tecnologia de laticínios tem sido *Lc. lactis* (Limsowtin, *et al.*, 2002; Teuber & Geis, 2006). *Lactococcus* são cocos homofermentativos, microaerófilos, que crescem a temperaturas de 10°C, mas não a 45°C. Fermentam a glucose exclusivamente em ácido láctico L (+). Para o seu crescimento necessitam de proteínas, péptidos, aminoácidos específicos, derivados de ácidos nucleicos e vitaminas. Não são β-hemolíticas e são fracamente α-hemolíticas. Ubíquos no

ambiente e nos alimentos. Normalmente encontram-se em plantas e peles de animais. *Lc. plantarum* tem sido isolado principalmente de plantas; *Lc. garvieae* de peixes, mamíferos e leite; *Lc. piscium* de salmão (Williams, Fryer & Collins, 1990; Nagalakshmi, Sumathi, Kanimozhi & Sivakumar, 2013). A presença de lactococos no leite cru deve-se à contaminação do mesmo a partir da forragem, durante a ordenha. As duas espécies mais isoladas no leite cru, queijo e outros produtos lácteos são *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Geralmente estas duas subespécies atingem, em queijos fabricados com leite cru, teores elevados ($>10^8$ ufc/g) logo no primeiro dia depois de fabricados e mantêm-se ao longo do período de maturação.

2.3.1.4. *Leuconostoc*

Este género é composto por 22 espécies e 3 subespécies. As espécies mais associadas aos produtos lácteos são: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *lactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Tamime, 2002a).

Leuconostoc são bactérias anaeróbias facultativas, apresentando-se em forma de cocos ou de bastonetes ovais, frequentemente em cadeias curtas ou em pares. A maior parte das estirpes apresenta um crescimento ótimo entre 20 e 30 °C. Diferenciam-se das outras BAL por serem cocos heterofermentativos e produzirem frequentemente o isómero D (-), CO₂ e compostos aromáticos, a partir da glucose. A produção do isómero D (-) a partir da glucose distingue *Leuconostoc* de *Lactobacillus* heterofermentativos similares, que também produzem isómeros de ácido láctico D (-) e L (+) a partir da glucose e de *Lactococcus* produtores de L (+) (Fox, Guinee, Cogan & Mcsweeney, 2000).

Leuconostoc são utilizados na indústria de laticínios como culturas de arranque, no entanto encontram-se muitas vezes disseminados nas salas de ordenha e nas unidades de produção de laticínios. A sua presença em leites fermentados de modo tradicional e de fermentação espontânea é frequente. Apesar da fraca atividade acidificante e proteolítica é utilizado juntamente com *Lactococcus lactis* como microrganismo aromatizante, ou seja, metabolizam o citrato e produzem compostos aromáticos (Hassan & Frank, 2001; Ogier, Cassalta, Farrokh & Saihi, 2008). Algumas estirpes são produtoras de EPS, os quais contribuem para realçar as propriedades reológicas (diminuindo a sinérese, melhorando a textura e modificando a estrutura) e a perceção sensorial (firmeza e cremosidade) dos leites fermentados e outros produtos lácteos (Tamime, 2002).

2.3.1.5. *Enterococcus*

O género *Enterococcus* inclui mais de 52 espécies (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ee/Enterococcus.html>, 28 de dezembro 2013). As espécies mais frequentemente isoladas em leites e produtos lácteos são *E. faecium* e *E. faecalis*; *E. durans* é menos frequente neste tipo

de produtos e *E. hirae* e *E. casseliflavus* são ocasionalmente isolados (Franz, Holzapfel & Stiles, 1999).

Segundo Suzzi *et al.* (2000) a presença de *E. durans* em produtos lácteos é subestimada, quando na verdade tem sido isolado, com frequência, destes produtos.

As bactérias pertencentes ao género *Enterococcus*, apresentam-se em forma de cocos que podem aparecer isolados, em pares ou em cadeias curtas, anaeróbias facultativas, com baixa percentagem G+C (< 50%) (Giraffa, 2003; Foulquié Moreno *et al.*, 2006). Embora cresçam a temperaturas entre 10 e 45 °C a temperatura ótima de crescimento é a 35 °C; crescem em elevadas concentrações de NaCl (até 6,5%) e numa vasta gama de valores de pH (4,6-9,6). Hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares (Franz *et al.*, 2003; Ogier & Serror, 2008). São quimiorganotróficos e produzem ácido láctico (L-) a partir de hexoses por fermentação ácido-láctica homofermentativa (Franz *et al.*, 2003).

São ubíquos, podendo ser encontrados no solo, na matéria vegetal, na água e em diversos produtos fermentados, embora o seu habitat principal seja o trato gastrointestinal dos seres humanos e animais (Giraffa, 2002). *E. faecium* é mais frequente no trato gastrointestinal do gado leiteiro (Giraffa, 2003). O seu carácter ubíquo é provavelmente resultado da disseminação de fezes e da sua natural tolerância a condições ambientais adversas (Giraffa, 2002).

Encontram-se frequentemente em produtos lácteos, particularmente em queijos produzidos nos países europeus do mediterrâneo, onde se usa leite cru (Ogier *et al.*, 2008). A produção de queijo depende da microbiota presente no leite e/ou da que é introduzida durante todo o processo de fabrico, onde se incluem os recipientes de recolha de leite, os utensílios usados no fabrico do queijo e as pessoas intervenientes em todo o processo (Benkerroum, 2013).

2.3.1.6. *Pediococcus*

O género *Pediococcus* é composto por 15 espécies. Apresentam-se em forma de cocos, aos pares ou em tétradas. São aeróbios facultativos. Produzem isómeros de ácido láctico D (-) e L (+) a partir da glucose. Algumas espécies deste género podem resistir a condições ambientais extremas, como temperaturas e pH altos, e elevadas concentrações de NaCl. Geralmente são isolados de plantas e de vários alimentos fermentados, como couves fermentadas, enchidos fermentados e como microrganismos de decomposição da cerveja. Apesar de não crescer bem no leite, devido à utilização irregular da lactose, *P. pentosaceus* e *P. acidilactici* têm sido isolados a partir de produtos lácteos (Schutte, 2013).

P. acidilactici é utilizado em conjunto com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* na produção do “Biokys”, um leite fermentado com propriedades terapêuticas, produzido na República Checa (Tamime, 2002a).

2.3.2. Leveduras

2.3.2.1. Características gerais

As leveduras são organismos unicelulares, eucariotas, aeróbios e/ou anaeróbios facultativos que podem crescer em vários nichos ecológicos como o solo, a água do mar, os frutos, as plantas e as algas, sendo também encontradas no trato gastrintestinal e na pele dos animais (Schutte, 2013). Estes organismos heterotróficos utilizam carbono orgânico para produzir álcool e dióxido de carbono e aparecem frequentemente em alimentos processados com algum teor de açúcar (Jakobsen & Narvhus, 1996; Gadaga, Mutukumira & Narvhus, 2001). A interação entre leveduras e bactérias lácticas em alimentos fermentados está relacionada com a grande capacidade de se desenvolverem a um pH baixo (Jacques & Casaregola, 2008).

De acordo com Viljoen (2001) e Jespersen (2003) as leveduras possuem um potencial metabólico diversificado e desempenham um papel importante na fermentação de alguns produtos lácteos e na maturação de muitas variedades de queijos, na medida em que têm um papel positivo no desenvolvimento das características sensoriais, sendo por isso utilizadas como culturas de arranque. Contudo, podem atuar como microrganismos de decomposição, provocando defeitos típicos como a produção de gás, maus sabores ou sabor a leveduras (yeasty off-flavours), alteração da textura e aumento da acidez. Algumas leveduras, devido à sua ação contra os fungos responsáveis pela decomposição de alimentos, têm sido utilizadas como agentes de biocontrole ou bioconservantes, e outras têm sido estudadas para poderem ser usadas como novos organismos probióticos (Fleet, 2007).

Normalmente são detetadas em grande quantidade, o que reflete uma boa adaptação ao substrato rico em proteínas, lípidos, hidratos de carbono e ácidos orgânicos. A sua ampla distribuição é consequência da atividade lipolítica e proteolítica, da capacidade de fermentar/assimilar lactose, de utilizar ácidos orgânicos, da capacidade de crescimento a baixas temperaturas e a baixos valores de atividade da água, e da resistência a altas concentrações de NaCl e a produtos de limpeza e sanificação (Fleet, 1990; Jakobsen & Narvhus, 1996; Viljoen, 2001; Narvhus & Gadaga, 2003; Corbaci, Ucar & Yalcin, 2012).

O pH dos leites fermentados proporciona um ambiente seletivo para o crescimento das leveduras, mas desfavorável para a maioria das bactérias. A deterioração dos produtos fermentados ocorre quando as concentrações de leveduras atingem $10^5 - 10^6$ células/g (Fleet, 1990). A adição de frutas, açúcar, mel ou nozes a leites fermentados como o iogurte incentiva a deterioração, uma vez que podem estar contaminados ou fornecer mais carbono orgânico para o crescimento das leveduras (Jakobsen & Narvhus, 1996; Narvhus & Gadaga, 2003).

As leveduras mais isoladas em produtos lácteos pertencem aos géneros *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Candida* e *Saccharomyces*. Nos iogurtes e nos queijos predominam as

espécies pertencentes aos géneros *Debaryomyces* e *Kluyveromyces*, enquanto as espécies *Candida lusitanae* e *Candida krusei* são mais frequentes em iogurtes. As espécies pertencentes ao género *Yarrowia* são frequentes em queijos, leites e iogurtes, o que pode ser atribuído à sua atividade lipolítica e proteolítica. O iogurte, devido à adição de açúcar e/ou fruta, está mais sujeito à ação decompositora de *Saccharomyces cerevisiae* (Viljoen, 2001).

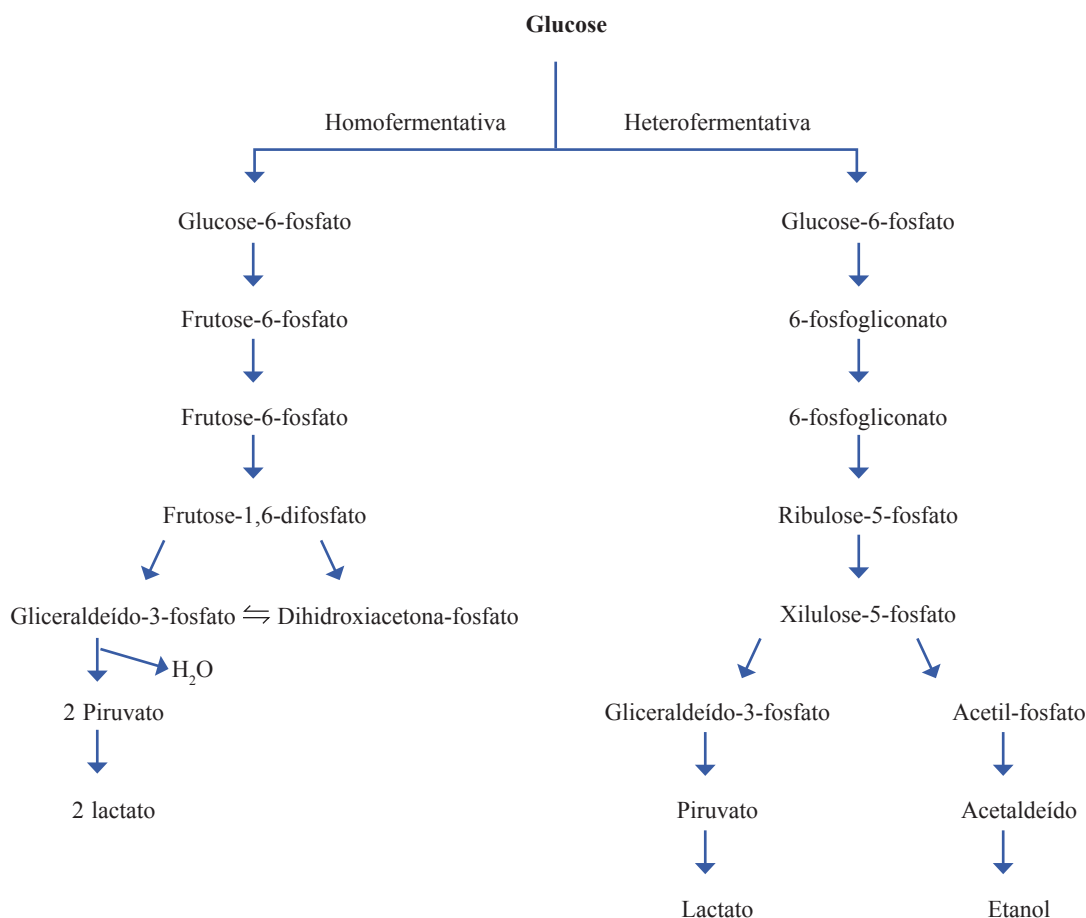
2.4. Metabolismo das bactérias produtoras do ácido láctico

Muitos membros da ordem Lactobacillales produzem ácido láctico como produto único ou principal da fermentação e muitas vezes são referidos como BAL. A este grupo pertencem *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. O maior género desta ordem é *Lactobacillus*, com cerca de 100 espécies (Willey, Sherwood & Woolverton, 2008). Todas as BAL produzem ácido láctico a partir de hexoses. A energia não é obtida nem através da cadeia de transporte de eletrões ou cadeia citocrómica nem do ciclo de Krebs, mas sim através da fosforilação a nível do substrato. O ácido láctico produzido através das várias vias de fermentação tanto pode ter a configuração L (+) ou D (-) ou uma mistura de ambos, dependendo da estereospecificidade da desidrogenase lactato presente nas células (Caplice & Fitzgerald, 1999). De acordo com o seu metabolismo, as BAL classificam-se em homofermentativas e heterofermentativas (Carr, Chill & Maida, 2002) (Fig. 4).

Algumas BAL, como *Lactococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp. e algumas espécies de *Lactobacillus*, são homofermentativas, uma vez que o produto final do seu metabolismo é o ácido láctico, o que lhes confere um grande potencial industrial. O catabolismo da glucose é efetuado pela via Embden-Meyerhof-Parnas, tendo o piruvato como intermediário importante para a formação do ácido láctico, em que são geradas duas moles de lactato por mol de glucose, produzindo aproximadamente duas vezes mais energia por mole de glucose que as heterofermentativas. As bactérias heterofermentativas pertencentes aos géneros *Weissella* e *Leuconostoc* e algumas espécies de *Lactobacillus* não possuem a enzima frutose-1,6-difosfato-aldolase e por isso usam uma via metabólica alternativa da glicólise que é a via da hexose-monofosfato ou via das pentoses fosfato, em que se produzem quantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono e acetato ou etanol. Os compostos intermediários importantes na via heterofermentativa são o ácido pirúvico e o acetaldeído (Caplice & Fitzgerald, 1999; Giraffa *et al.*, 2010).

Segundo Stanley (1998) e Savadogo *et al.* (2006) a quantidade de ácido láctico produzida pelas BAL homofermentativas é de 1,8 moles por mol de glucose fermentada; enquanto as BAL heterofermentativas produzem aproximadamente 1 mol de ácido láctico por mol de glucose, além de quantidades apreciáveis de produtos secundários.

Figura 4. Esquema geral da fermentação da glucose em ácido láctico. Adaptada de Caplice & Fitzgerald (1999).



2.5. Composição química dos leites fermentados

A composição química dos leites fermentados depende do leite original e do metabolismo específico das bactérias que se vão desenvolvendo no mesmo, do local ou da região e do processo de fabrico (El-Baradei *et al.*, 2008). Algumas práticas de concentração do leite, como a remoção do soro, o período de fermentação, a adição ou remoção da gordura e a adição de água provocam alterações na composição química do leite (Oberman & Libudzisz, 1998).

Os leites fermentados *ititu*, *lben* e *amasi* apresentaram elevados teores de sólidos totais após a remoção do soro, cerca de 20,87%, 37,5% e 16,5%, respetivamente. Os valores médios para os principais componentes do *lben* foram: acidez titulável – 8,2 g de ácido láctico; gordura – 8,9 g/l; proteína total – 25,6 g/l; lactose total – 26,9 g/l; matéria seca – 89 g/l (Tantaoui-Elaraki & El Marrakchi, 1987).

Segundo Oberman e Libudzisz (1998), embora os leites fermentados apresentem grande variabilidade na sua composição química, há certos valores que são de referência (Tabela 3).

Tabela 3. Composição química dos leites fermentados. Adaptada de Oberman & Libudzisz (1998).

Parâmetros	
Matéria seca	ca 14-18%
Proteína	4-6%
Gordura	0,1-10%
Lactose	2-3%
Ácido láctico	0,6-1,3%
Hidratos de carbono	5-25%
pH	3,8-4,6
Álcool	Kefir- 0,5-2% Kumis-2-3%

Na Tabela 4 podemos observar, em leites fermentados produzidos em África, diferenças em certos parâmetros como a gordura, as proteínas e os sólidos totais.

Tabela 4. Composição química de alguns leites fermentados tradicionais produzidos em África. Adaptada de Bille (2009).

Produto (Nº amostras)	pH	Ácido láctico (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Sólidos totais (%)	Cinza (%)	Referências
<i>Ititu</i> (20)	3,65a (3,5-3,9)b	1,92a (1,5-2,6)b	9,1a (3,0-5,0)b	7,17a (5,4-9,2)b	20,87a (15-27)b	0,74a (0,6- 0,8)b	Kassaye <i>et al.</i> (1991)
<i>Nono</i> (100)	4,3a (4,1-4,3)b	0,65a (0,5-0,9)b	0,83a (0,2-1,5)b	2,55a (1,2-5,7)b	6,084a (2,8- 13)b	0,41a (0,2-0,8)b	Bankole & Okagbue (1992)
<i>Zabady</i> (50)	3,7a (3,0-4,4)b	1,01a (0,6-1,5)b	3,62a (1,1-6,8)b	4,17a (3,1-5,6)b	14,32a (11-19)b	0,65a (0,4-1,4)b	El-Sadek <i>et al.</i> (1972)
<i>rayeb lben</i> (42)	4,2a 4,1b	0,67a 1,041b	2,22a 16,47b	3,1a 15,8b	10,7a 37,5b	0,54a 1,26b	Hamama & Bayi (1991)
<i>Amasi</i> (10)	3,98a (3,5-4,3)b	0,97a	5,89a (2,6-9,1)b	4,57a (3,3-7,6)b	16,53a (13-21)b	S/D	Mutukumira (1995)

a) média

b) intervalo

S/D – sem dados

2.6. Fermentos lácticos

2.6.1. Definição e classificação

O fermento láctico pode ser definido como uma preparação microbiana contendo um elevado número de células de um ou mais géneros e espécies de BAL selecionadas. É muito conhecido o emprego das BAL como fermentos lácticos na produção de produtos lácteos fermentados, principalmente leite acidificado, iogurtes e queijos.

A maior parte das culturas de arranque atualmente disponíveis foram obtidas, duma maneira ou de outra, a partir de leites fermentados artesanais com uma composição indefinida (Ferusu & Muzondo, 1990; Garabal, 2007).

Apesar das diferenças existentes entre as estirpes bacterianas presentes nos leites fermentados, principalmente no que diz respeito à taxa de crescimento, a indústria de laticínios tem-se preocupado em mantê-las e reproduzi-las através da técnica de “back-sloping”, o que pode ter sido responsável por alterações que, com o passar do tempo, conduziram ao desaparecimento de algumas estirpes.

Segundo Garabal (2007) a utilização de culturas autóctones na produção de produtos lácteos fermentados artesanais pode preservar a diversidade de bactérias associadas a um produto específico e proporcionar a produção de produtos lácteos fermentados com características típicas.

A produção de novos produtos lácteos exige a utilização de novas estirpes microbianas com novas propriedades, o que tem levado à procura de novas estirpes para a inovação e diversificação de produtos lácteos. Estas novas estirpes podem ser adquiridas pela exploração da biodiversidade natural dos vários nichos ecológicos ou pela modificação genética de estirpes de produções conhecidas (El Soda *et al.*, 2003).

Os fermentos podem classificar-se em puros quando compostos por uma só estirpe de BAL; mistos quando compostos por várias estirpes de BAL, que constituem uma cultura dinâmica e complexa; e naturais quando constituídos por uma mistura de BAL indefinidas. Normalmente os fermentos utilizados são mistos, havendo diferenças na rapidez de multiplicação, atividade proteolítica e lipolítica, produção de bacteriocinas, sensibilidade e resistência aos fagos, o que de certa forma exige vigilância no momento da sua utilização (Hassan & Frank, 2001; Morais, 2004).

As BAL utilizadas como fermentos na produção de laticínios podem ser divididas segundo a temperatura ótima de multiplicação, em mesófilas quando aquela temperatura é de 20 – 30°C e em termófilas quando é de 30 – 45 °C. Os produtos lácteos fermentados tradicionais oriundos da Europa do Norte e Ocidental contêm BAL mesófilas e os oriundos de países subtropicais contêm, geralmente, BAL termófilas.

O tipo de fermentação pretendido condiciona a escolha do fermento. Assim, podem ser utilizados fermentos homofermentativos, em que o ácido láctico é o maior produto residual do metabolismo da lactose e como tal contribui para a rápida diminuição do pH; ou fermentos heterofermentativos, em que para além do ácido láctico são produzidos ácido acético, ácido propiónico, etanol, diacetilo e dióxido de carbono, entre outros (Morais, 2004).

Os lactobacilos isolados de produtos lácteos têm uma longa história de utilização segura e têm sido muito utilizados como fermentos, tanto na indústria de alimentos para consumo humano (leites fermentados, produtos cárneos, panificação e bebidas alcoólicas) como na indústria de alimentos para animais (silagens) (Carr *et al.*, 2002; WHO/FAO, 2001).

2.6.2. Função dos fermentos lácticos

A principal função das BAL é a de promover uma rápida acidificação durante o processo fermentativo e assim garantir a segurança do alimento através da descida do pH para valores que inibem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e de decomposição (Giraffa *et al.*, 2010). A rapidez de descida do pH é um fator extremamente importante quer durante a produção quer no produto final (Johnson & Steele, 1997). A quantidade final de ácido láctico, o principal produto resultante da atividade metabólica dos fermentos, e a taxa de acidificação durante a produção do iogurte dependem da estirpe ou da associação de estirpes (Chammas *et al.*, 2006). As variações encontradas na atividade acidificante das diferentes estirpes dependem da aptidão específica para assimilar os compostos nutritivos presentes no substrato.

As BAL têm também a finalidade de contribuir para o desenvolvimento das características sensoriais e nutricionais desejadas no produto, podendo ainda oferecer benefícios à saúde do consumidor como as proporcionadas pelos probióticos (Stanley, 1998; Bruno & Carvalho, 2009).

Segundo Stanley (1998) as BAL podem contribuir para o desenvolvimento do sabor e do aroma através: a) da modificação das condições do meio, para que ocorram reações enzimáticas e não enzimáticas, como por exemplo a acidificação e a alteração do potencial de oxidação-redução, particularmente em queijos; b) da produção de metabolitos diretamente a partir da lactose e do citrato, que contribuem para o sabor; c) da hidrólise das proteínas e da gordura do leite, do que resultam péptidos, aminoácidos e compostos voláteis que contribuem para o desenvolvimento do sabor e do aroma.

Para Giraffa *et al.* (2010) alguns microrganismos são intencionalmente adicionados aos leites fermentados devido à sua capacidade para produzir compostos aromáticos como o diacetilo e melhorar o aroma, o sabor e a textura dos produtos. Os diferentes sabores que os produtos fermentados apresentam estão associados à utilização de diferentes estirpes de BAL.

A textura dos leites fermentados depende essencialmente do ácido láctico produzido pelas BAL, uma vez que durante a sua produção não se acrescentam enzimas coagulantes e a coagulação é consequência da descida progressiva do pH até ao ponto isoelétrico da caseína, momento em que se desestabiliza e precipita (Stanley, 1998). As BAL produtoras de EPS têm sido utilizadas para melhorar a textura e/ou a viscosidade dos produtos. As estirpes produtoras de EPS que mais têm sido utilizadas com esta finalidade são *Streptococcus thermophilus*, *Lb. bulgaricus* e algumas estirpes de *Lactococcus lactis* (Stanley, 1998).

Segundo Johnson e Steele (1997) o aroma e o sabor desejados dependem diretamente da atividade metabólica do fermento e da microbiota secundária, que é deliberadamente adicionada para produzir aromas e sabores. Por isso a seleção dos fermentos depende muito do aroma e do sabor que se pretende para um dado produto.

2.6.3. Composição dos fermentos lácticos

Conforme se pode verificar na Tabela 5 os fermentos são compostos por BAL heterofermentativas, homofermentativas mesófilas ou termófilas, por leveduras e bolores (Oberman & Libudzisz, 1998).

Lactobacillus heterofermentativos (*Lb. brevis*, *Lb. fermentum* e *Lb. kefir*) fazem parte de uma microbiota variada onde também se incluem várias espécies de leveduras, que são utilizadas para a produção do *kefir* e do *kumis*, leites com algum teor de álcool e de dióxido de carbono (Johnson & Steele, 1997).

De acordo com Beresford, Fitzsimons, Brennan e Cogan (2001) os fermentos lácticos podem ainda integrar, para além de BAL iniciadoras, microrganismos secundários que também são denominados de culturas adjuvantes. Enquanto as BAL iniciadoras são responsáveis pela produção de ácido durante o processo de fabrico dos produtos lácteos, os microrganismos secundários estão geralmente envolvidos na definição de características sensoriais (Garabal, 2007).

2.6.4. Fermentos naturais

Na maior parte das fermentações que ocorrem de forma natural é utilizada a técnica “back-sloping”, em que uma combinação de microrganismos, normalmente designada de cultura artesanal, existente no produto anterior é inoculada no novo produto (Narvhus, 2003).

As culturas de arranque utilizadas na produção artesanal são, normalmente, constituídas por microrganismos presentes no leite, no ar ou à superfície dos recipientes. As mais comuns são constituídas por lactobacilos naturalmente presentes no leite. Outras culturas de arranque podem também conter microrganismos que produzem álcool e dióxido de carbono, como estreptococos e algumas leveduras, e por isso é que os produtos em que são utilizadas, como o *kefir* e o *airag*, têm alguma percentagem de álcool e gás (Zamfir *et al.*, 2006).

Apesar da atuação imprevisível dos microrganismos presentes, o soro proveniente do dessoramento da coalhada é muitas vezes utilizado para a produção de queijos, de que é exemplo o queijo Mozzarella do sul de Itália, que é feito com leite de búfala. A quantidade de bactérias lácticas normalmente presente no leite cru é relativamente pequena, o que faz com que a acidificação do leite seja lenta (Wouters *et al.*, 2002).

Segundo El Soda *et al.* (2003) a microbiota láctica autóctone representa um depósito natural de culturas microbianas que nunca foi exposto a qualquer seleção industrial. A composição destas culturas artesanais é complexa e variada, podendo incluir estirpes de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Leuconostoc* sp.

O fermento natural utilizado para a produção do leite fermentado tradicional *matsoni*, semelhante ao iogurte produzido no Cáucaso, contém lactobacilos, estreptococos, por vezes lactococos e pequenas quantidades de leveduras (Uchida, Urashima, Chanishvili, Arai & Motoshima, 2007). Algumas BAL isoladas do leite fermentado naturalmente, produzido no Zimbábwe, têm sido utilizadas para a produção industrial de produtos lácteos fermentados (Ferusu & Muzondo, 1990).

Tabela 5. Microrganismos utilizados na produção tradicional de leites fermentados. Adaptada de Oberman & Libudzisz (1998).

Género	Espécie
BACTÉRIAS	
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>
	<i>Lb. helveticus</i>
	<i>Lb. acidophilus</i>
	<i>Lb. casei</i>
	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. kefir</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>
	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>
	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
	<i>Leuc. lactis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. pentosaceus</i>
	<i>P. acidilactici</i>
<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>
LEVEDURAS	
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. marxianus</i> subsp. <i>marxianus</i>
	<i>K. marxianus</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
<i>Candida</i>	<i>C. lactis</i>
	<i>C. kefir</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	<i>S. lactis</i>
<i>Torulasporea</i>	<i>T. delbrueckii</i>
BOLORES	
<i>Geotrichum</i>	<i>G. candidum</i>

A maioria das indústrias de laticínios utiliza fermentos comerciais para promover uma rápida acidificação, uma redução do número de estirpes bacterianas no produto e uma certa uniformidade nos produtos lácteos fermentados. No entanto, a utilização de fermentos comerciais tem uma desvantagem, uma vez que há perda da microbiota natural presente nos leites. Segundo Wouters *et al.* (2002) a utilização de fermentos comerciais melhora a qualidade tecnológica dos produtos lácteos até certo ponto, embora limite não só a sua biodiversidade mas também a variabilidade das características organolépticas dos produtos finais.

2.6.5. Fermentos lácticos não tradicionais

É importante salientar a presença de um grupo de bactérias que participam na fermentação do leite e que normalmente formam a microbiota secundária dos queijos, designadas em inglês por “non-starter lactic bacteria” (NSLB), ou seja, em tradução livre são “bactérias lácticas não iniciadoras” ou BAL “não iniciadoras”. Estas não fazem parte dos fermentos tradicionais, mas são essenciais para a produção de sabores e aromas característicos (Wouters *et al.*, 2002).

A microbiota NSLB é majoritariamente constituída por lactobacilos mesófilos homofermentativos (*Lb. rhamnosus* e *Lb. curvatus*) e por espécies do género *Pediococcus* (*P. acidilactici* e *P. pentosaceus*); podem também estar presentes lactobacilos heterofermentativos obrigatórios (*Lb. fermentum* e *Lb. brevis*), porém com menos frequência (Cogan *et al.*, 1997; Beresford *et al.*, 2001). A adição de estirpes de *Lb. plantarum* como cultura adjuvante em queijos pode ter um efeito positivo na degradação de alguns compostos metabólicos (Todorov & Franco, 2010).

2.7. Segurança higio-sanitária dos alimentos fermentados

As diarreias agudas estão entre a maior causa de morte nos países em vias de desenvolvimento e são o fator que mais contribui para a malnutrição das crianças com idade inferior a 5 anos. A maioria das doenças diarreicas é de origem alimentar, sendo a água de consumo e as papas de cereais reconstituídas com água de consumo e utilizadas durante o desmame das crianças, as principais fontes de microrganismos patogénicos. Por outro lado, a falta de higiene no ato de preparação dos alimentos pode ser responsável pela contaminação dos mesmos, o que contribui para a elevada taxa de mortalidade infantil devido a enfermidades como a diarreia, a mal absorção de nutrientes e a desnutrição.

A nível mundial, particularmente na Ásia e em África, a fermentação tem sido a técnica utilizada para tornar os alimentos seguros (Abd El Gawad *et al.*, 2010). Em alguns países Africanos esta tecnologia tem sido aplicada para a preparação de alimentos destinados ao desmame de crianças. No Quênia, Nigéria, Tanzânia e Uganda têm por hábito alimentar as crianças com

cereais ou tubérculos fermentados. Nas áreas onde a água de consumo não é de boa qualidade higiénica utiliza-se a fermentação para a produção de bebidas, o que contribui para a redução do risco de surgirem doenças provocadas pelo consumo de água. A fermentação, ao inibir o crescimento de bactérias patogénicas, é uma forma económica de conservação dos alimentos, sobretudo quando a refrigeração ou outros meios de armazenamento seguros não se encontram disponíveis, e ao mesmo tempo reforça a qualidade nutritiva de certos alimentos (Sahlim, 1999).

Segundo Mufandaedaza, Viljoen, Ferusu e Gadaga (2006) não são frequentes as doenças de origem alimentar provocadas pelo consumo de leites fermentados, graças à acidez que inibe a maioria dos microrganismos patogénicos, às bacteriocinas produzidas por algumas BAL e ao baixo potencial de oxidação-redução. No entanto, alguns estudos realizados em leites fermentados produzidos em Marrocos, na Nigéria (El-Marrakchi, Hamama & El-Oumami, 1993; Benkerroum & Tamime, 2004; Obi & Ikenebomeh, 2007; Okonkwo, 2011) e no Sudão (Abdalla & El-Zubier, 2006; Benkerroum, 2013) referem a presença de bactérias de origem fecal como coliformes, *Escherichia coli* e *Streptococcus* do grupo D em concentrações superiores a 10^4 ufc/mL e microrganismos patogénicos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* Enteritidis.

De acordo com El-Baradei *et al.* (2008) e Ouadghiri *et al.* (2009) a qualidade e a segurança dum produto fermentado dependem de fatores como: a) a qualidade da matéria-prima; b) a contaminação inicial, que por sua vez depende das condições locais; c) a higiene e o modo de higienização dos materiais; d) a qualidade do fermento; e) as condições de fermentação, como por exemplo a temperatura; f) a acidez. No entanto, muitas vezes não é fácil controlar estes parâmetros, particularmente quando o processamento dos produtos é realizado em condições rudimentares.

Os leites fermentados naturalmente apresentam, geralmente, elevados teores de microrganismos, entre os quais se incluem as BAL, os bolores e as leveduras; por vezes aparecem algumas bactérias patogénicas, uma vez que a produção destes leites tradicionais é normalmente artesanal (Abd El Gawad *et al.*, 2010). Estes produtos não oferecem segurança higio-sanitária, o que advém, na maior parte das vezes, da deficiente qualidade higiénica da matéria-prima que está contaminada, da falta de pasteurização, da ausência de controlo do processo de fermentação e de conservação.

De acordo com Suleiman e Tsenkova (2007) a qualidade e a segurança do produto final são influenciadas não só pelos elevados teores de BAL e de leveduras, mas também pela sua capacidade de multiplicação e de propiciar uma boa fermentação.

2.8. Importância nutricional e terapêutica dos leites fermentados

2.8.1. Importância nutricional dos leites fermentados

O leite e os produtos lácteos fermentados têm um papel muito importante na dieta das populações pastoris e agropastoris, fazendo parte da dieta básica das mesmas, juntamente com alguns cereais como o milho e o sorgo. A quantidade de leite consumido no meio rural depende da existência de criadores de gado numa dada comunidade.

A composição nutricional do leite fermentado é semelhante à do leite cru, a partir do qual foi produzido. Durante a sua produção não há perda de nutrientes mas sim uma concentração dos mesmos, por isso alguns autores afirmam que os leites fermentados têm maior valor nutritivo do que do leite cru. Por outro lado, as estirpes probióticas utilizadas durante a fermentação podem influenciar diretamente a qualidade nutricional e as características sensoriais do produto final (Mazahreh & Ershidat, 2009; Abd El Gawad *et al.*, 2010). Os produtos lácteos fermentados (queijos e iogurtes) são excelentes fontes de vitaminas e sais minerais, incluindo a riboflavina, o fósforo e o cálcio.

As populações pastoris de muitas regiões dos continentes Africano, Asiático e Americano nem sempre conseguem suprir as suas necessidades em nutrientes através do consumo de leite que obtêm dos seus animais, por estes serem de raças autóctones e com um baixo índice de produção, além de que as quantidades de leite disponíveis para o consumo das populações varia de região para região, de acordo com a estação do ano. Um estudo realizado sobre o papel do leite na dieta dos povos que se dedicam à pastorícia no sul do Darfur, no Sudão, demonstrou que apenas 25% das necessidades energéticas eram supridas pelo leite, o que equivalia ao consumo de um litro de leite por dia, correspondendo a cerca de 700 kcal/litro. Nas comunidades pastoris do Mali, cuja dieta é à base de leite, o fornecimento energético está aquém das suas necessidades se comparadas com as comunidades agropastoris, cuja dieta é também constituída por cereais e outros alimentos (FAO, 1990).

Outro estudo realizado numa comunidade Massai, etnia do Quênia que se dedica à pastorícia, demonstrou que o contributo do leite fermentado para as necessidades energéticas de cada Massai era de 51 a 63%, correspondendo ao consumo de cerca de 1,9 a 2,3 litros de leite por dia. Embora este consumo satisfaça as necessidades em proteínas e aminoácidos essenciais, as necessidades em ferro, niacina, vitamina C, vitamina A, tiamina e energéticas nunca são completamente satisfeitas através de uma dieta à base de leite, como a praticada pelos pastores, particularmente na estação das chuvas quando o leite é abundante (FAO, 1990).

Uma das justificações para a não satisfação das necessidades vitamínicas prende-se com a diminuição da estabilidade das vitaminas, devido a alterações de pH e ao aquecimento associado à preparação da matéria-prima antes da fermentação. O tratamento térmico da matéria-prima,

neste caso o leite, pode provocar uma redução das quantidades de vitamina B1 e B12 (Walstra, Geurts, Noomen, Jellema & van Bockel, 2001).

Em países da América, como a Bolívia, o Peru e o Paraguai a maioria do leite produzido é usado na produção de produtos lácteos tradicionais (FAO, 1990). Durante a fermentação há aumento de aminoácidos e da disponibilidade de aminoácidos essenciais como a lisina, o triptofano, a metionina, a histidina e a isoleucina, melhorando desta forma a digestibilidade das proteínas em geral (Sulieman, Dirar, Elkhalifa & Ali, 2009). Os leites fermentados, devido ao processo de fermentação, podem sofrer algumas alterações na sua composição. A quantidade de prolina encontrada no iogurte é aproximadamente 45 vezes superior à do leite não fermentado; por outro lado, os teores de arginina, histidina, alanina, valina, metionina e isoleucina podem ser 4 a 9 vezes superiores aos do leite original. O iogurte de leite de cabra é mais rico em alguns aminoácidos, como a treonina, a glicina e a serina, que o iogurte de leite de vaca (Bille, 2009).

A fermentação pode alterar a composição vitamínica do leite, tanto pela síntese de vitaminas por microrganismos fermentativos, como pela perda de vitaminas através do metabolismo de microrganismos fermentativos e ainda pela perda de vitaminas através de reações químicas não diretamente relacionadas com a fermentação. O equilíbrio depende das bactérias presentes no leite e da diversidade de BAL (Bille, 2009).

Na Índia, o leite fermentado *dahi* e outros produtos semelhantes como o *lassi*, o *kadhi* e o *shrikhand* contribuem significativamente para a dieta das populações, sendo frequentemente utilizados para complementar as refeições de cada dia. A adição, complementar, de 250g de *dahi* às refeições à base de arroz fornecidas às crianças, promove o aumento de ácido pirúvico e láctico (FAO, 1990).

De acordo com Adesokan, Odetoyinbo, Ekanola, Avanrenren e Fakarede (2011) e Ogbonna *et al.* (2012) os leites fermentados consumidos na Nigéria são não só uma importante fonte de proteína, cálcio, fósforo, vitamina A, vitaminas do complexo B, C e E, mas também de ácidos gordos e lactose. Os produtos lácteos tradicionais têm um grande peso na dieta das populações que têm preferência por este tipo de produtos, que lhes satisfazem não só os hábitos de consumo mas também as suas necessidades em nutrientes (cálcio e proteínas).

Durante o processamento industrial do iogurte ocorre o aumento de algumas vitaminas como a niacina, a piridoxina e o ácido fólico, que são sintetizadas pelos microrganismos utilizados na fermentação – *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Antoine, 2011).

Os leites fermentados são fonte de vitaminas, incluindo as vitaminas B6, B12, riboflavina, niacina, ácido fólico, biotina e ácido pantoténico. O ácido fólico é uma das vitaminas do grupo B que pode ser sintetizada e produzida por algumas espécies de bactérias lácticas como

Streptococcus thermophilus e *Bifidobacterium*, enquanto outras como *Lactobacillus* utilizam o ácido fólico existente no meio. Os microrganismos acima referidos, quando utilizados em conjunto durante a fermentação, aumentam seis vezes mais a concentração de ácido fólico no leite (Crittenden, Martinez & Playne, 2003).

Segundo Bos, Gaudichon e Tom (2000) o conteúdo de proteína no iogurte é mais elevado do que no leite, devido à adição de leite em pó magro durante a produção. A proteína presente no iogurte é mais facilmente digerida do que a do leite fresco, devido à atividade das peptidases produzidas pelas BAL, o que aumenta a concentração de aminoácidos livres como a prolina e a glicina no produto final. Entre as BAL utilizadas como fermentos na produção de iogurtes, *Lactobacillus bulgaricus* possui uma atividade proteolítica mais intensa durante a fermentação do leite do que *Streptococcus thermophilus*. Os iogurtes têm concentrações mais elevadas de *conjugated linoleic acid* (CLA) do que o leite a partir do qual foram produzidos. O valor energético dos leites fermentados mantém-se, apenas ocorre uma redução insignificante quando se dá a conversão da lactose em ácido láctico.

Sahlim (1999) refere que, em função da cultura láctica usada, o *kefir* produzido a partir de diferentes grãos de *kefir* apresentou um aumento de piridoxina, cobalamina, ácido fólico e biotina superior a 20% e uma redução de tiamina, riboflavina, ácido nicotínico e ácido pantoténico superior a 20%. Segundo o mesmo autor, o conteúdo em sais minerais não é afetado pela fermentação, a menos que alguns sais sejam adicionados aos produtos durante a fermentação ou através da lixiviação, quando a porção líquida é separada dos produtos fermentados. Por vezes, quando a fermentação ocorre num recipiente de metal, alguns minerais são solubilizados através do produto fermentado, o que pode causar um aumento no conteúdo mineral do produto. Segundo Antoine (2011) o teor em sais minerais não é alterado, mas a acidificação aumenta a porção ionizada de minerais, o que facilita a sua absorção a nível intestinal.

Alguns leites fermentados e alguns queijos proporcionam 3-4 vezes mais cálcio do que o que é ingerido através da dieta. O iogurte é rico não só em sais minerais mas também em potássio, magnésio, fósforo e zinco. O cálcio presente no iogurte é melhor absorvido porque este produto fermentado é melhor tolerado por pessoas deficientes em lactase. Segundo Mazahreh e Ershidat (2009) o pH dos iogurtes provoca a ionização do cálcio facilitando assim a sua absorção a nível intestinal. A biodisponibilidade do cálcio no iogurte é maior do que em outros produtos lácteos e o iogurte pode aumentar a mineralização óssea, mais do que os produtos lácteos não fermentados. Abd El-Salam, Al-Dekheil, Babkr, Farahna e Mousa (2010) referem que o leite fermentado de égua (*kumis*) consumido na Mongólia, para além de ser rico em fermentos, possui elevados teores de oligoelementos, antibióticos, vitaminas A, B1, B2, C, D e E, álcool etílico, ácidos láctico e carbónico.

2.8.2. Importância terapêutica dos leites fermentados

A popularidade das bebidas lácteas fermentadas tem vindo a aumentar não apenas pelo seu gosto atrativo, mas também devido aos seus benefícios para a saúde. Algumas estirpes de BAL têm grande importância em termos de saúde, uma vez que promovem o desenvolvimento de uma microbiota benéfica no trato intestinal (Caplice & Fitzgerald, 1999; Buritti & Saad, 2007).

Os produtos lácteos fermentados têm uma importância significativa devido ao seu efeito terapêutico. Em África, os leites fermentados *amasi*, *kule naoto*, *nunu*, *zabady*, *leben*, *ergo* e muitos outros têm sido utilizados tradicionalmente no tratamento de diarreias, obstipações e outras situações (Abdelgadir *et al.*, 1998; Ferusu & Muzondo, 1990; Mathara *et al.*, 2004; El-Baradei *et al.*, 2008; Akabanda *et al.*, 2010; Amenu, 2013).

Existem também referências sobre a utilização de leites fermentados produzidos em outras regiões do mundo, como o leite fermentado *dahi* consumido na Índia, o leite fermentado *matsoni* consumido na Geórgia e muitos outros, os quais têm um efeito benéfico na digestão e no tratamento de enfermidades de índole intestinal (Zamfir *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2007; Rashid *et al.*, 2007; Sarkar, 2008).

De acordo com Dirar (1997) citado por Abdelgadir *et al.* (1998) o leite fermentado tem sido utilizado com sucesso, sobretudo em países em desenvolvimento, durante o desmame saudável de crianças, como substituto de alimentos que podem representar perigo por poderem veicular microrganismos causadores de diarreias em crianças com idade inferior a 5 anos.

O *kumis* é utilizado pelos Mongóis para fins terapêuticos, como na recuperação de estados de fadiga, na cura de doenças do trato gastrointestinal e da tuberculose (Abd El-Salam *et al.*, 2010).

2.8.3. Efeito probiótico

O conceito probiótico “a favor da vida” foi proposto pela primeira vez pelo cientista Russo Elie Metchnikoff, laureado com o prémio Nobel, o qual sugeriu que a longevidade dos camponeses búlgaros resultava do consumo de produtos lácteos fermentados. Este cientista concluiu que os *Lactobacillus* fermentadores, presentes em produtos lácteos fermentados, influenciavam de forma positiva a microbiota intestinal, diminuindo a atividade microbiana tóxica (Mahasneh & Abbas, 2010).

Atualmente a World Health Organization (OMS) e a FAO, definem probióticos como “microrganismos vivos que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios ao hospedeiro” para além do efeito nutritivo básico que lhe é inerente (FAO/ WHO, 2001; Giraffa *et al.*, 2010; Jamaly *et al.*, 2011; Antoine, 2011).

Os microrganismos mais utilizados como probióticos pertencem ao grupo das BAL. As espécies pertencentes aos géneros *Lactobacillus* (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei/Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *Lb. salivarius*) (Giraffa *et al.*, 2010), *Bifidobacterium* (Yateem, Balba, Al-Suraya, Al-Mutairi & Al-Daher, 2008) e *Enterococcus* (Ljungh & Wadstrom, 2006) são as mais utilizadas e mais frequentemente estudadas como probióticas. Há estirpes de *Lb. plantarum* que foram selecionadas como probióticas, como é o caso de *Lb. plantarum* 299v e Lp 01 (de Vries, Vaughan, Kleerebezem & de Vos, 2006; Mathara *et al.*, 2008).

Patrignani, Lanciotti, Mathara, Guerzoni e Holzapfel (2006) referem que estirpes de *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. plantarum* têm sido utilizadas em produtos probióticos e cada vez mais incorporadas em novos tipos de iogurtes.

Algumas estirpes de *Lb. casei/Lb. paracasei* têm também sido utilizadas como probióticas na produção de leites fermentados (Tamime, 2002).

Em estudos recentes foram analisadas as propriedades funcionais de lactobacilos mesófilos isolados a partir de alimentos autóctones e concluiu-se que muitos podem sobreviver ao trânsito gastrointestinal (Ortu *et al.*, 2007), por isso tais alimentos podem ser considerados como potenciais fontes de uma grande variedade de microrganismos probióticos (Anukamk & Reid, 2009).

Algumas estirpes probióticas de *Lactobacillus* têm sido utilizadas, com muita segurança, para a produção industrial de determinados produtos comercializados em todo o mundo como: “Danisco” (EUA Madison WI), “Probiomics” (Austrália), “Yakult” (Japão), “Danone” (França) e “ProbiAB” (Suécia) (Carr *et al.*, 2002).

De acordo com Buriti e Saad (2007) *Lb. casei* var. *Shirota*, utilizada na produção do *yakult*, é uma das bactérias mais estudadas como probiótico. O consumo regular deste produto tem sido relacionado, direta ou indiretamente, com a prevenção do cancro do cólon e da bexiga (Itsaranuwat, Al-Haddad & Robinson, 2003).

De acordo com Saito (2004), Liong e Shah (2005) e Mahasneh e Abbas (2010) a eleição de um microrganismo como probiótico deve obedecer a três critérios:

- efeito benéfico para o hospedeiro;
- ausência de patogenicidade e toxicidade para o hospedeiro;
- capacidade para sobreviver ao trânsito gastrointestinal

A atividade das bactérias probióticas consiste na adesão e colonização do intestino do hospedeiro, na supressão do desenvolvimento das bactérias patogénicas, na produção de substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas, na melhoria da função de barreira intestinal e na estimulação da imunidade do hospedeiro (Sanders, 2003; Stevenson & Blauw, 2011).

A adesão ao intestino é um critério importante para a seleção de bactérias probióticas. Com efeito, a capacidade do probiótico aderir ao epitélio intestinal é considerada um pré-requisito para colonizar o trato gastrointestinal humano e para exercer efeitos benéficos, tais como a exclusão de bactérias enteropatogênicas (Collado, Gueimonde, Hernandez, Sanz & Salmi-nen, 2005; Michail, 2005; Marco, Pavan & Kleerebezem, 2006) uma vez que na primeira fase das infecções intestinais ocorre a adesão de bactérias patogênicas à superfície da mucosa intestinal.

Existem vários estudos que comprovam o efeito benéfico dos probióticos sobre a saúde, tais como:

a) Melhoria do metabolismo da lactose

A intolerância à lactose é comum a muitas pessoas em qualquer parte do mundo e a sua frequência varia consideravelmente entre os diferentes povos e grupos étnicos. Esta intolerância resulta da deficiência da enzima β -D-galactosidase responsável pela hidrólise da lactose em glucose e galactose. Quando este processo não é completo, ou seja, quando a lactose não é hidrolisada em componentes mais simples o mal-estar surge após o consumo de leite fresco ou de produtos lácteos, devido à formação de ácidos orgânicos de cadeia curta e de gases como o hidrogênio, o metano e o dióxido de carbono resultante da ação microbiana sobre a lactose não digerida (Drouault & Corthier 2001; Solomons, 2002). A flatulência, os espamos intestinais e as dores adominais são os sintomas da intolerância à lactose (Drouault & Corthier, 2001).

As culturas tradicionais utilizadas no fabrico do iogurte produzem quantidades substanciais de β -D-galactosidase, por isso o iogurte normal e os probióticos são bem tolerados, assim como os leites fermentados naturalmente (Beukes *et al.*, 2001). Estirpes de *Lb. bulgaricus* e *S. thermophilus* podem hidrolizar cerca de 20 a 30% da lactose contida no iogurte o que contribui para uma boa tolerância ao mesmo (Mazahreh & Ershidat, 2009).

Segundo Rizkalla *et al.* (2000) a maior parte dos estudos referem que indivíduos que consomem iogurtes contendo culturas vivas absorvem e digerem melhor a lactose, além de terem atenuados os sintomas gastrointestinais. O benefício na absorção da lactose também foi verificado em indivíduos saudáveis sem problemas de digestão da lactose.

b) Propriedades anticancerígenas

Os produtos fermentados que contêm probióticos têm efeito inibitório sobre o cancro do cólon. As aminas heterocíclicas produzidas durante a cozedura dos alimentos e os elevados teores de creatina, aminoácidos livres e açúcares são responsáveis pelo aparecimento do cancro do cólon em animais e humanos (Liong, 2008; Davis & Milner, 2009; Jamaly *et al.*, 2011).

O efeito anticancerígeno das bactérias probióticas é devido à remoção das fontes de substâncias pró-cancerígenas ou de enzimas que lideram a sua produção, melhorando o equilíbrio da microbiota intestinal, normalizando a permeabilidade intestinal, e prevenindo ou retardando a absorção de toxinas. Alguns ácidos gordos de cadeia curta produzidos por *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* e *Bifidobacterium* são inibidores da produção de produtos carcinogênicos através da redução quantitativa de enzimas como a β -glucuronidase, a azoredutase e a nitroreductase (Cenci, Rossi, Trotta & Caldini, 2002).

O'Sullivan, Thornton, O'Sullivan e Collins (1992) referem que os finlandeses são portadores de numerosos lactobacilos com propriedades anticancerígenas, porque consomem grandes quantidades de iogurte.

A supressão de células tumorais pode, também, ser indiretamente mediada através da ativação do sistema imunitário, de modo que todas as células bacterianas e fragmentos da parede celular das BAL podem ativar os macrófagos do hospedeiro. Algumas BAL presentes em leites fermentados podem desempenhar um papel significativo na inibição da carcinogênese, uma vez que ativam os macrófagos e os linfócitos, estimulam o aumento das IgA e reduzem a taxa de enzimas responsáveis pela ativação de alguns pró-carcinogêneos (Drouault & Corthier, 2001; Michail, 2005; Saad, 2006), o que contribui para proteger o hospedeiro de infecções por microrganismos enteropatogênicos e de tumores. *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Bifidobacterium* influenciam a regulação do γ -interferão, que atua como antiviral e antiproliferativo, podendo ativar as células “killer” na prevenção de cancro do cólon (Pool-Zobel *et al.*, 1996; Michail, 2005).

c) Redução do colesterol

A ingestão de leites fermentados que contenham um grande número de bactérias probióticas, aproximadamente 10^8 a 10^9 bactérias/g, por um indivíduo com hipercolesterolemia, pode resultar na descida do colesterol de 3,0 para 1,5 g/L (Shah, 2007; Ramirez, Ulloa, Gonzalez, Ulloa & Romero, 2011).

No entanto, nem todas as espécies e estirpes de bactérias utilizadas na produção de produtos lácteos fermentados apresentam um efeito hipocolesterolémico. Estudos realizados por Agerholm-Larsen *et al.* (2000) referem a redução significativa do nível de colesterol no soro de um voluntário (8,4%), após 8 semanas de ingestão de 450 mL de iogurte dinamarquês da marca Gaio contendo estirpes de *Streptococcus thermophilus* e *Enterococcus faecium*. Contudo um outro estudo levado a cabo com iogurte contendo estirpes de *Streptococcus thermophilus*, *Lb. acidophilus* e *Lb. rhamnosus*, revelou que estas três bactérias não apresentavam efeito hipocolesterolémico.

O aumento de colesterol no organismo, sobretudo das LDL ou lipoproteínas de baixa densidade, constitui um risco, na medida em que aumenta a probabilidade de ocorrência da doença coronária cardíaca. Os indivíduos das etnias Massai e Samburu do Quênia, apesar de ingerirem elevadas quantidades de produtos lácteos gordos e carne de bovino, apresentam baixos teores de colesterol e uma reduzida incidência de doença coronária cardíaca, o que despertou o interesse sobre o efeito dos leites fermentados e de outros produtos lácteos na redução do colesterol (Di Rienzo, 2013).

d) Tratamento de certas afeções intestinais

Algumas BAL são utilizadas tanto na prevenção e tratamento de diarreias de natureza infecciosa e distúrbios digestivos ligados ao tratamento com antibióticos, como no restabelecimento da microbiota intestinal normal durante a terapia com antibióticos (Marteau, de Vrese, Cellier & Schrezenmeir, 2001). Por outro lado, as BAL também exercem uma ação anti-inflamatória em doenças intestinais como a Doença Inflamatória Intestinal (DII) (Daniel *et al.*, 2006), a Síndrome do Cólon Irritável (SCI) (Jonkers & Stockbrügger, 2003; Shah, 2007; Mazahreh & Ershidat, 2009) e no controlo de gastrites associadas a *Helicobacter pylori* (Ouweland, Salminen & Isolauri, 2002; Sgouras *et al.*, 2004; Saad, 2006; Lesbros-Pantoflickova, Corthésy-Theulaz & Blum, 2007).

Heyman (2000) refere que a ingestão de leites fermentados contendo *Lb. rhamnosus* GG surtem bons resultados no tratamento de diarreias por *Rotavirus* em crianças, uma vez que reforça as defesas imunitárias locais através do aumento específico das IgA e de outras imunoglobulinas anti *Rotavirus*. Algumas bebidas pediátricas que contêm *Bifidobacterium animalis*, *Lb. acidophilus* e *Lb. reuteri*, têm sido usadas com sucesso no tratamento de diarreias, em crianças, provocadas por *Rotavirus*. De acordo com Mahasneh e Abbas (2010) muitos estudos referem a utilização de *Saccharomyces boulardii* no tratamento de diarreias associadas ao uso de antibióticos antidiarreicos.

Os mecanismos de ação apontados para o tratamento de distúrbios intestinais são: a) produção de substâncias antimicrobianas e bacteriocinas que vão impedir o desenvolvimento de microrganismos patogénicos e importa aqui referir a ação de dois compostos produzidos por *Lb. rhamnosus* GG; b) modulação do sistema imunitário através da capacidade dos probióticos em ativar os macrófagos e linfócitos, aumentando as IgA e a produção do γ -interferão (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002; Michail, 2005; Saad, 2006; Shah, 2007); c) inibição da adesão de microrganismos patogénicos ao epitélio intestinal.

Segundo Drouault e Corthier (2001) a ingestão de leite fermentado contendo *Lb. acidophilus* La1 aumenta *in vivo* a atividade fagocitária dos granulócitos no Homem, enquanto a ingestão

de uma mistura de *Bifidobacterium bifidum* e de *Lb. acidophilus* – o Infloran – proporciona um aumento da percentagem de linfócitos B no sangue. Uma forte adesão das BAL ao epitélio intestinal interfere com os microrganismos patogénicos, devido à saturação dos locais de fixação.

Algumas espécies, como *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* e *Lb. reuteri* (Marteau *et al.*, 2001), são adicionadas ao leite para promover o seu efeito probiótico no intestino humano. *Lb. reuteri* possui um grande potencial para prevenir ou tratar vários tipos de infeções gastrintestinais, por isso pode ser utilizado como um probiótico efetivo. *Lb. helveticus* proporciona a libertação de alguns aminoácidos no trato intestinal e modifica o perfil de eluição das proteínas digeridas. Para além dos efeitos acima referidos, os probióticos também contribuem para o tratamento de infeções urogenitais (Reid, 2000; Falagas, Betsi, Tokas & Athanasiou, 2006) e de infeções que ocorrem durante a gravidez, e ainda para atenuar a sintomatologia associada às alergias e ao eczema atópico (Marschan *et al.*, 2008), para o alívio dos sintomas de artrite reumatoide (Marteau *et al.*, 2001) e de encefalopatia hepática (Solga, 2003).

2.9. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas em leites fermentados

2.9.1. Produção de compostos antimicrobianos

As BAL têm atividade antagónica relativamente a muitos microrganismos, incluindo os microrganismos patogénicos e os de decomposição, uma vez que são produtoras de compostos com ação antimicrobiana, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio, dióxido de carbono, diacetilo, reuterina, bacteriocinas ou proteínas bactericidas (Caplice & Fitzgerald, 1999; Khurana & Kanawjia, 2007). Também produzem compostos antifúngicos como ácidos gordos ou ácido feniláctico (Franz *et al.*, 1999, Lavermicocca *et al.*, 2000; Savadogo *et al.*, 2006; Rashid *et al.*, 2007; Assefa *et al.*, 2008). Estes compostos além de impedirem o desenvolvimento de microrganismos também prolongam a vida útil do produto e acrescentam valor terapêutico ao mesmo (Khurana & Kanawjia, 2007).

O efeito antimicrobiano direto dos ácidos orgânicos, incluindo o ácido láctico, o acético e o propiónico, que são produtos finais da fermentação láctica, tem sido estudado por vários autores. O antagonismo dos ácidos resulta da sua ação sobre a membrana citoplasmática das bactérias, que interfere com a manutenção do potencial de membrana e inibe o transporte ativo, podendo ser mediado tanto por ácidos dissociados como por ácidos não dissociados (Caplice & Fitzgerald, 1999). Cada composto antimicrobiano produzido durante a fermentação constitui um obstáculo adicional para a sobrevivência e/ou proliferação tanto de bactérias patogénicas como de bactérias de decomposição, desde a produção dos géneros alimentícios até ao momento de serem consumidos. Os ácidos orgânicos ao penetrarem no interior das

células de algumas bactérias patogénicas inibem algumas funções metabólicas e diminuem o pH intracelular, o que inibe a atividade de enzimas essenciais.

A atividade antimicrobiana de cada um dos ácidos não é igual em determinada concentração molar. O ácido acético é mais inibidor do que o ácido láctico e pode inibir bolores, leveduras e bactérias. O ácido propiónico, que inibe o desenvolvimento de alguns fungos e bactérias, encontra-se em alguns produtos comerciais como o Microgard^R e o Bioprofit^R. O Microgard^R é um leite desnatado, fermentado com a estirpe *Propionobacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (Al-Zoresck *et al.*, 1991 citado por Khurana & Kanawjia, 2007) que inibe bolores e bactérias Gram negativas. O Bioprofit^R, que contém *Lb. rhamnosus* LC 705 e *Propionibacterium freudenreichii* JS, tem ação inibidora sobre bolores, leveduras e *Bacillus* sp. em produtos lácteos, silagens e pão (Soumalainen, 1999 citado por Khurana & Kanawjia, 2007). A contribuição do acetaldeído e do etanol como bioconservadores não é tão grande, uma vez que as quantidades produzidas não são suficientes para ter efeito inibidor sobre os microrganismos. O baixo pH, provocado pelo ácido acético ou láctico produzido por estas bactérias tem um efeito bactericida ou bacteriostático nos intestinos (Caplice & Fitzgerald, 1999; Shah, 2007).

O peróxido de hidrogénio (H₂O₂) é produzido pelas BAL na presença de oxigénio por ação de oxidases e peroxidases. O seu efeito antimicrobiano pode resultar tanto da oxidação de grupos sulfidrílo, o que vai provocar a desnaturação de diversas enzimas, como da peroxidação de lípidos da membrana, o que vai aumentar a sua permeabilidade, ou pode estar na origem de radicais livres capazes de danificar ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (Ouwehand, 1998; Caplice & Fitzgerald, 1999).

Adams e Nicolaidis (1997) referiram a inibição da multiplicação de *S. aureus* por ação de H₂O₂ produzido pelas bactérias do fermento utilizado na produção de iogurtes. O peróxido de hidrogénio, ao ativar o sistema da lactoperoxidase, inibe um largo espetro de bactérias Gram positivas e Gram negativas.

As BAL produzem dióxido de carbono por via heterofermentativa, quer a partir do malato e do citrato, quer por descarboxilação de aminoácidos. O CO₂, além de criar condições de anaerobiose que inibem as descarboxilações enzimáticas, é também responsável por alterações na permeabilidade da membrana. O CO₂, ao criar um ambiente anaeróbio, torna-se tóxico para alguns microrganismos aeróbios dos alimentos, através da sua ação sobre a membrana celular e da sua capacidade para reduzir o pH interno e externo (Adams & Nicolaidis, 1997).

O diacetilo, que resulta da fermentação do citrato pelas BAL, é responsável pelo aroma e sabor da manteiga e dos leites fermentados (Cogan & Hill, 1993). A sua atividade antimicrobiana deve-se ao facto de reagir com a proteína de ligação da arginina, afetando a sua utilização. As bactérias Gram negativas, bolores e leveduras são mais sensíveis ao efeito do diacetilo do

que as bactérias Gram positivas. A quantidade de diacetilo em alimentos fermentados não é suficiente para exercer, eficazmente, o efeito antimicrobiano (Caplice & Fitzgerald, 1999).

A reuterina é produzida durante a fase estacionária de crescimento anaeróbio de *Lactobacillus reuteri* numa mistura de glucose e glicerol ou gliceraldeído. Inibe o desenvolvimento de vírus, fungos, protozoários e bactérias através da inibição da ribonucleótido-redutase (Caplice & Fitzgerald, 1999).

É de referir que alguns agentes patogénicos toleram a acidez criada por algumas culturas de arranque. Por conseguinte, os produtos fermentados não devem ser considerados totalmente isentos de microrganismos patogénicos (Leyer, Wang & Johnson, 1995; Gahan, O'Driscoll & Hill, 1996; Benkerroum, 2013).

2.9.2. Bacteriocinas

As bacteriocinas, produzidas por algumas BAL, são compostos antimicrobianos que podem ser proteínas simples ou moléculas complexas com porções lipídicas e glucídicas. São péptidos extracelulares de síntese ribossomal, com atividade bactericida ou bacteriostática para bactérias geneticamente relacionadas.

Têm grande importância porque, devido à sua natureza proteica, são rapidamente digeridas pelas proteases presentes no trato gastrointestinal, ao contrário dos antibióticos correntes (Bromberg, Moreno, Zaganini, Delboni & Oliveira, 2004; Abdelbasset & Djamila, 2008), por isso se consideram substâncias geralmente reconhecidas como seguras (Generally Recognized as Safety – GRAS) (Khurana & Kanawjia, 2007). A ação das bacteriocinas não afeta a bactéria produtora, que possui um mecanismo específico de auto proteção (Caplice & Fitzgerald, 1999).

As bacteriocinas têm como alvo de ação a membrana citoplasmática. Por isso têm, geralmente, maior efeito inibidor sobre as bactérias Gram positivas do que sobre as bactérias Gram negativas, porque estas possuem na membrana externa uma barreira protetora constituída pelos lipopolissacáridos (LPS) (Abee, Krockel & Hill, 1995).

As bacteriocinas produzidas pelas BAL classificam-se em quatro grandes classes I, II, III e IV. As das classes I e II são pequenos péptidos, essencialmente hidrofóbicas e termoestáveis. À classe I pertencem os lantibióticos, constituídos por aminoácidos que sofreram modificações pós-traducionais, de que é exemplo a nisina. A nisina é produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e a sua ação inibidora atinge um largo espetro de bactérias Gram positivas, incluindo microrganismos patogénicos (Cleveland, Montville, Nes & Chikindas, 2001; Sava-dogo *et al.*, 2006). É uma das bacteriocinas mais bem caracterizada e a mais utilizada como aditivo em alimentos no mundo inteiro. A classe II é constituída por não-lantibióticos. As da classe III são de maiores dimensões e termolábeis. As da classe IV são compostas por uma

mistura indefinida de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, ou seja, são compostas por uma metade proteica a que se ligam grupos lipídicos ou glucídicos necessários à atividade (Nes & Holo, 2000; Abdelbasset & Djamila, 2008).

Entre as várias bacteriocinas produzidas, apenas a plantaricina C e a pediocina PA-1/AcH produzida por *Pediococcus* spp., são de origem láctea. A plantaricina C pertence às bacteriocinas da classe I ou lantibióticos e a Pediocina PA-1/AcH é a bacteriocina protótipo da classe II (Corsetti & Gobbetti, 2002), normalmente utilizada no fabrico de salsichas e salame italiano por inibir o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* (Foegeding, Thomas, Pilkington & Klaenhammer, 1992).

A ação combinada de um grande número de BAL associada à descida do pH, cria condições desfavoráveis à multiplicação de muitos microrganismos patogénicos, entre os quais *Listeria monocytogenes* (Savadoço *et al.*, 2006; Abdelbasset & Djamila, 2008).

A utilização de bacteriocinas como bioconservantes naturais de alimentos tem sido amplamente estudada (Cleveland *et al.*, 2001). Algumas estirpes de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* produzem enterocinas, que são péptidos bactericidas pertencentes às bacteriocinas da classe II. *Bifidobacterium* e *Lb. acidophilus* produzem várias substâncias antimicrobianas e bacteriocinas que são comercializadas com os nomes de “Bifidoli”, “Bifilong”, “Lactocidin”, “Acidolin”, “Acidophilin”, “Lactacium-B” e também proteínas inibidoras que no geral inibem o desenvolvimento de várias bactérias patogénicas (Kaktcham, Zambou, Tchouanguép, El-Soda & Choudharyk, 2012). Estas bactérias têm efeito antagónico para *Escherichia coli* enteropatogénica, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Cl. perfringens* (Franz *et al.*, 2003).

Olasupo, Schillinger e Holzapfel (2001) referem que a estirpe de *Lactococcus lactis* isolada de um produto lácteo denominado *wara*, consumido na Nigéria, produzia uma bacteriocina que inibia a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Por sua vez, Ghrairi, Manai, Berjeaud e Frère (2004) demonstraram a atividade antilisteria das BAL isoladas a partir do queijo tunisino Rigouta.

Savadoço, Ouattara, Bassole e Traoré (2004b) verificaram que oito estirpes de BAL pertencentes a *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus* sp., *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Lactococcus* sp., isoladas de amostras de leite fermentado produzido no Burkina Faso, produziam uma bacteriocina com efeito antimicrobiano em relação a *Enterococcus faecalis* 1039907 CIP, *Bacillus cereus* 13569 LMG, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 e *Escherichia coli* 105182 CIP.

Segundo Abdelbasset e Djamila (2008) entre as bactérias produtoras de bacteriocinas pertencentes ao género *Lactobacillus* destaca-se *Lb. plantarum*, por ter potencial para ser usada

como cultura de arranque numa grande variedade de alimentos fermentados. Esta estirpe produz substâncias antimicrobianas como as plantaricinas, que são ativas contra certos microrganismos patogénicos Gram positivos (Mathara *et al.*, 2008). Recentemente Todorov e Franco (2010) referem que estirpes de *Lb. plantarum* isoladas a partir do *amasi* produzido no Zimbábue possuíam capacidade para produzir bacteriocinas.

Estudos realizados nos Camarões por Kaktcham *et al.* (2012) demonstraram que as BAL presentes no leite fermentado *kossam* produziam ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio e bacteriocinas que contribuíam para a bioconservação do mesmo.

2.10. Importância das bactérias lácticas na indústria de lacticínios

Hoje em dia os consumidores são muito exigentes quanto ao sabor, ao aroma e à consistência dos produtos lácteos. É por isso que a indústria de lacticínios está cada vez mais interessada em explorar novas possibilidades que permitam expandir e diversificar a sua gama de produtos. A procura de novas estirpes que tenham efeitos desejáveis sobre as características dos produtos lácteos é enorme, e neste contexto os produtos artesanais são considerados fontes potenciais de muitos microrganismos (Wouters *et al.*, 2002). A produção industrial dos produtos lácteos proporciona ao consumidor um produto com características desejáveis, resultante da atividade metabólica e das propriedades tecnológicas das estirpes durante o seu crescimento no leite, o que leva à padronização da qualidade dos produtos e à reprodutibilidade dos processos com sucesso.

As BAL têm um papel importante porque: produzem ácido láctico, que é responsável pela descida do pH; produzem substâncias inibidoras responsáveis por interações entre estirpes bacterianas; produzem enzimas que intervêm na degradação de proteínas, em especial da caseína, durante a maturação de queijos; são responsáveis pela formação de aromas, a partir do citrato. A capacidade de produzir ácido láctico a partir do metabolismo dos açúcares, em particular da lactose, é a propriedade mais importante destas bactérias na indústria de lacticínios, porque ao acumular-se no leite reduz o seu pH para valores que inibem o desenvolvimento de bactérias patogénicas e de decomposição (Caridi, 2003; Tannok, 2004; Yi *et al.*, 2011), o que contribui para uma melhoria substancial da qualidade higiénica dos produtos, aumento do período de vida útil e estabilidade do produto final.

Os lactobacilos são utilizados, como culturas de arranque ou culturas complementares, para a produção de vários produtos fermentados pelo facto de provocarem uma rápida redução do seu pH. Além disto, a atividade proteolítica, a produção de compostos aromáticos, de bacteriocinas e de EPS tornam mais relevante a aplicação deste grupo de BAL em biotecnologia alimentar (Leroy & De Vusyst, 2004).

A acidez produzida pelos ácidos láctico e acético é importante, uma vez que promove a coagulação do leite e vai modificar as suas propriedades reológicas (textura) e organolépticas (flavour), contribuindo assim para o desenvolvimento da qualidade gastronómica do produto (Savadoço *et al.*, 2004; Vlieg & Hugenholtz, 2007). Este processo é complementado pela produção e, em alguns casos, pela secreção de enzimas hidrolíticas, principalmente proteí­nases e peptidases, e ainda, embora em menor quantidade, de lipases e esterases (Durlu-Ozkaya, Xanthopoulos, Tunail & Litopoulou-Tzanetaki, 2001), ao mesmo tempo que se vai preservando e conservando o alto valor nutritivo dos produtos alimentares fermentados.

A presença de bactérias lácticas fermentativas é crucial para o desenvolvimento das propriedades intrínsecas dos produtos alimentares fermentados, uma vez que a sua atividade metabólica é responsável pela aceitabilidade dos leites e queijos fermentados, pelo contributo que têm no realce do “flavour” e desenvolvimento da textura (Zambou *et al.*, 2007; Adnan & Tan, 2007; Huertas, 2010). A conversão da fração proteica, mais particularmente dos aminoácidos, contribui para o desenvolvimento dos vários componentes do “flavour” (Hugenholtz, 2008).

As BAL pertencentes aos géneros não patogénicos e com efeitos benéficos – *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Streptococcus* – têm sido tradicionalmente utilizadas na indústria alimentar, onde desempenham um papel importante, devido à grande produção e consumo de vários produtos lácteos fermentados, principalmente queijos e leites fermentados acidificados (Garabal, 2007).

De acordo com Adnan e Tan (2007) as BAL homofermentativas têm grande potencial para serem utilizadas na indústria, porque produzem maiores quantidades de ácido láctico do que as BAL heterofermentativas, que por produzirem dióxido de carbono e outros tipos de ácidos orgânicos em conjunto com o ácido láctico são consideradas de baixo potencial industrial.

3. Materiais e Métodos

3.1. Produção artesanal do *omavele*

3.1.1. Ordenha

A ordenha para a obtenção do leite era feita de manhã muito cedo por elementos do sexo masculino. Em algumas localidades o leite era recolhido para um recipiente de madeira semelhante a uma tigela, designado por “eholo”, como mostra a Figura 5. Posteriormente e em alguns casos o leite era filtrado para uma cabaça através de uma rede metálica ou plástica ou ainda através de um pano, com a ajuda de um funil (Fig. 6). Nesta fase por vezes são adicionadas cascas ou raízes de plantas que na região são designadas por “mucopacopa”, “omututu” e “omukwa wopossi” em língua nativa.

Figura 5. Ordenha manual.



Figura 6. Transferência do leite para a cabaça.



A cabaça, também vulgarmente conhecida por “echanquelo”, é um recipiente artesanal obtido a partir da *Lagenaria siceraria*, uma cucurbitácea que é seca ao sol depois de removido o seu conteúdo.

Normalmente a cabaça contém uma pequena porção da produção de *omavele* do dia anterior.

3.1.2. Incubação e batedura

O recipiente (cabaça) com o leite era colocado num local arejado, à temperatura ambiente (22-26°C). Esse local, geralmente era a cozinha, sendo esta um espaço rudimentar construído de pau a pique e coberto de capim, destinado à preparação de alimentos.

A partir do meio do dia, quando a temperatura era mais elevada, o recipiente com o leite em fase de coagulação era colocado ao sol e batido durante cerca de 5 minutos com movimentos de vaivém. A batedura ocorria, aproximadamente, de duas em duas horas, para promover a homogeneização e a acumulação de gordura à superfície, como mostra a Figura 7.

O procedimento referido demorava cerca de 9 horas, após o que o produto era considerado pronto a ser consumido.

É de salientar que na região em estudo, em virtude da fraca produção leiteira, impunha-se a produção diária de *omavele* (Fig. 8).

Na Figura 9 está esquematizado o modo de produção artesanal do *omavele*.

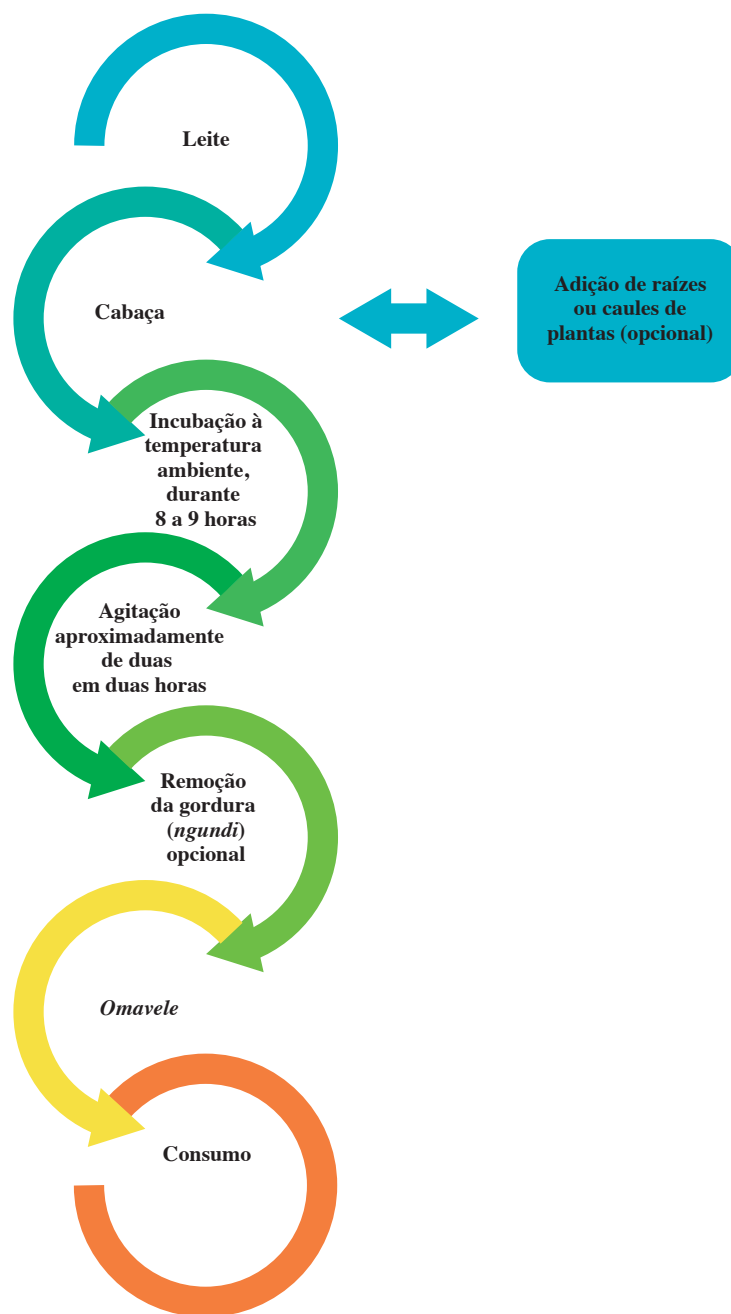
Figura 7. Agitação da cabaça (batedura).



Figura 8. *Omavele*.



Figura 9. Preparação artesanal do *omavele*.



3.2. Recolha de amostras

As amostras de *omavele* foram obtidas em 6 localidades rurais na província da Huíla, nomeadamente em Chibia (15° 10. 81 S, 13° 39. 96 E, 1.503 m), Huíla (15° 02. 92 S, 13°. 34. 17 E, 1.729 m), Humpata (14° 55. 30S, 13° 20. 90 E, 2.027 m), Mulondo (15° 38.54 S, 15° 12. 4 E, 1.152 m), Rio da Areia (15° 37. 01 S, 14° 03.34 E, 1.288 m) e Toco (14°.47. 20 S, 13°. 46. 45

E, 1.674 m). No mapa representado na Figura 10 estão indicadas as 6 localidades onde foram recolhidas as amostras de *omavele* que fizeram parte do estudo.

Figura 10. Mapa da província da Huíla – localidades em estudo.



Das 57 amostras de *omavele* utilizadas no nosso estudo 12 foram colhidas em Chibia, 3 em Huíla, 9 em Humpata, 5 em Mulondo, 13 em Rio da Areia e 15 em Toco. A recolha das amostras decorreu na época das chuvas e no início da época seca, durante os meses de fevereiro e março de 2007 e de maio e junho de 2008, 2009 e 2010. Em cada uma das localidades as amostras de *omavele* foram recolhidas de diferentes produtores.

As amostras foram colhidas diretamente das cabaças para frascos de vidro esterilizados de 250 mL, devidamente identificadas, acondicionadas em caixas isotérmicas com acumuladores térmicos e transportadas para o laboratório. Uma vez no laboratório as amostras foram colocadas no frigorífico à temperatura de refrigeração (2 – 4 °C) e foram analisadas em menos de 24 horas após a colheita.

3.3. Análises físico-químicas

A composição química de 15 das amostras obtidas em 2010 foi determinada por testes rápidos, utilizando o aparelho MilkoScan Minor 140H. Nas amostras de *omavele* determinou-se o pH, o teor de proteínas, de gorduras e de sólidos totais.

3.4. Análises microbiológicas

3.4.1. Contagem de microrganismos Aeróbios Totais a 30°C

A contagem de microrganismos Aeróbios Totais a 30° C consistiu na determinação do número total de microrganismos por contagem de colónias desenvolvidas em meio de cultura PCA (Plate Count Agar – Oxoid CM 0325). Semeou-se por incorporação 1mL de cada uma das diluições decimais (10^{-1} a 10^{-7}), efetuadas em Água peptonada (Oxoid CM 00093), por placa de Petri. A sementeira foi feita em duplicado. A cada placa de Petri foram adicionados cerca de 15 mL de meio de cultura PCA previamente fundido e mantido à temperatura de 45°C. Após solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas em aerobiose à temperatura de 30°C durante 72 horas.

Procedeu-se à contagem das colónias nas placas de Petri contendo entre 30 e 300 colónias. Os resultados foram expressos em logaritmo do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (\log_{10} ufc/mL).

3.4.2. Contagem de Bactérias lácticas

A contagem das BAL consistiu na determinação do número total de microrganismos presumivelmente pertencentes aos géneros *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. e *Enterococcus* spp. por colónias desenvolvidas em meios de cultura específicos.

3.4.2.1. Contagem de Lactobacilos

Semeou-se por incorporação em dupla camada 1 mL de cada uma das diluições decimais (10^{-1} a 10^{-7}), efetuadas em Água peptonada (Oxoid CM 00093), por placa de Petri. A sementeira foi feita em duplicado. A cada placa de Petri foram adicionados cerca de 2 x 15 mL de meio de cultura RGSA (Rogosa Agar – Oxoid CM 0627B) previamente fundido e mantido à temperatura de 45°C. Após solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 30°C durante 72 horas.

Procedeu-se à contagem das colónias nas placas de Petri contendo entre 30 e 300 colónias. Os resultados foram expressos em logaritmo do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (\log_{10} ufc/mL).

3.4.2.2. Contagem de Lactococos

Semeou-se por incorporação em dupla camada 1 mL de cada uma das diluições decimais (10^{-1} a 10^{-7}), efetuadas em Água peptonada (Oxoid CM 00093), por placa de Petri. A sementeira foi feita em duplicado. A cada placa de Petri foram adicionados cerca de 2 x 15 mL de meio de cultura M17

Agar (Oxoid CM 0785B) previamente fundido e mantido à temperatura de 45°C. Após solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 30°C durante 48h horas.

Procedeu-se à contagem das colónias nas placas de Petri contendo entre 30 e 300 colónias. Os resultados foram expressos em logaritmo do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (\log_{10} ufc/mL).

3.4.2.3. Contagem de Enterococos

Semeou-se por incorporação em dupla camada 1 mL de cada uma das diluições decimais (10^{-1} a 10^{-7}), efetuadas em Água peptonada (Oxoid CM 00093), por placa de Petri. A sementeira foi feita em duplicado. A cada placa de Petri foram adicionados cerca de 2 x 15 mL de meio de cultura KAA (Kanamycin Aesculin Azide Agar – Oxoid CM 591B) previamente fundido e mantido à temperatura de 45°C. Após solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 37°C durante 48 horas.

Procedeu-se à contagem das colónias nas placas de Petri contendo entre 30 e 300 colónias. Os resultados foram expressos em logaritmo do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (\log_{10} ufc/mL).

3.4.3. Contagem de Bolores e Leveduras

Semeou-se por incorporação em dupla camada 1 mL de cada uma das diluições decimais (10^{-1} a 10^{-7}), efetuadas em Água peptonada (Oxoid CM 00093), por placa de Petri. A sementeira foi feita em duplicado. A cada placa de Petri foram adicionados cerca de 15 ml de meio de cultura RB (Rose Bengal Chloranfenicol Agar – Oxoid CM0549) previamente fundido e mantido à temperatura de 45°C. Após solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 22°C durante 5 dias.

Procedeu-se à contagem das colónias nas placas de Petri contendo entre 30 e 300 colónias. Os resultados foram expressos em logaritmo do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (\log_{10} ufc/mL).

3.4.4. Contagem de Micrococos

Semeou-se por incorporação em dupla camada 1 mL de cada uma das diluições decimais (10^{-1} a 10^{-7}), efetuadas em Água peptonada (Oxoid CM 00093), por placa de Petri. A sementeira foi feita em duplicado. A cada placa de Petri foram adicionados cerca de 2x15 mL de meio de cultura MSA (Manitol Salt Agar – Oxoid CM 0085B) previamente fundido e mantido à temperatura de 45°C. Após solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 30°C durante 72 h horas.

Procedeu-se à contagem das colónias nas placas de Petri contendo entre 30 e 300 colónias. Os resultados foram expressos em logaritmo do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (\log_{10} ufc/mL).

3.4.5. Contagem de Enterobactérias

Semeou-se por incorporação em dupla camada 1 mL de cada uma das diluições decimais (10^{-1} a 10^{-7}), efetuadas em Água peptonada (Oxoid CM 00093), por placa de Petri. A sementeira foi feita em duplicado. A cada placa de Petri foram adicionados cerca de 2 x15 mL de meio de cultura VRGBA (Violet Red Glucose Bile Agar – Oxoid CM 0485B) previamente fundido e mantido à temperatura de 45°C. Após solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a 37°C durante 24 h horas.

Procedeu-se à contagem das colónias nas placas de Petri contendo entre 30 e 300 colónias. Os resultados foram expressos em logaritmo do número de unidades formadoras de colónias por mililitro (\log_{10} ufc/mL).

3.5. Isolamento e conservação de microrganismos

Selecionaram-se cinco colónias características em cada um dos meios de cultura utilizados para as bactérias lácticas e para bolores e leveduras. Cada uma das colónias selecionadas foi repicada, com o auxílio de uma ansa, para um tubo de ensaio com o meio de cultura específico do microrganismo isolado, de modo que a cada tubo correspondia uma determinada colónia de um microrganismo. As temperaturas de incubação foram de acordo com cada um dos microrganismos isolados. Após o período de incubação, os tubos de ensaio com os microrganismos isolados a partir do *omavele* foram acondicionados e levados, por mão própria, para o Centro de Investigação de Tecnologia de Alimentos (CERPTA) da Faculdade de Veterinária da Universidade Autónoma de Barcelona (UAB). Os isolados obtidos em 2007 foram liofilizados porque na altura havia constrangimentos financeiros que impossibilitaram a realização das análises de biologia molecular. Os isolados obtidos em 2009 e 2010 foram conservados nos respetivos meios de cultura à temperatura de refrigeração (2 – 4°C), uma vez que nesse ano já não havia constrangimentos à realização das análises de biologia molecular.

3.6. Identificação genotípica de Bactérias lácticas e Leveduras

Dos 1.140 isolados presuntivos de bactérias lácticas e leveduras enviados para o CERPTA, obtidos a partir das diferentes amostras de *omavele*, 141 foram submetidos a identificação genotípica.

3.6.1. Revivificação dos isolados selecionados

Os isolados presuntivos de Lactobacilos, Lactococos e Enterococos, tanto os liofilizados como os não liofilizados, foram semeados em placas de Petri com o respetivo meio de cultura – Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) (Oxoid CM 0361), M17 (Oxoid CM 0785B) Kanamycin Aesculin Azide Agar (Oxoid CM 591B). As placas semeadas foram incubadas em microaerofilia a 37°C durante 24 a 48 horas.

Os isolados de Leveduras, tanto os liofilizados como os não liofilizados, foram semeados em placas de Petri com Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid- CM0041B). As placas semeadas foram incubadas em aerobiose a 25°C durante 2 a 5 dias.

3.6.2. Extração de ADN

Para a extração do ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de cada um dos isolados selecionados utilizou-se o kit “DNeasy Blood and Tissue” (QIAGEN, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. Segundo este protocolo o concentrado de células, obtido após centrifugação durante 10 minutos a 5000 x g (7500 rpm), foi suspenso em 180 µl de tampão de lise enzimática. Após um período de incubação de pelo menos 30 minutos a 37°C, adicionou-se 25 µl de proteinase K e 200 µl de tampão AL, e após ter sido homogeneizado no vortex foi incubado a 56°C durante 30 minutos. Em seguida adicionou-se 200 µl de etanol e homogeneizou-se no vortex. A mistura obtida foi pipetada para uma coluna “DNeasy Mini spin” e centrifugada a ≥ 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto, após o que se rejeitou o filtrado obtido. Ao concentrado obtido adicionou-se 500 µl de tampão AW1 e centrifugou-se durante 1 minuto a ≥ 6000 x g (8000 rpm), rejeitando-se o filtrado. A seguir adicionou-se 500 µl de tampão AW2 e centrifugou-se a 20.000 x g (14.000 rpm) durante 3 minutos, rejeitando-se o filtrado. Ao concentrado obtido adicionou-se 200 µl de tampão AE e depois de ter sido incubado à temperatura ambiente durante 1 minuto foi centrifugado a ≥ 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto.

O ADN dos isolados em estudo foi conservado a – 22°C.

3.6.3. Amplificação do ADN por PCR

Depois de comprovada a identidade do ADN e de quantificado através do Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) procedeu-se à sua amplificação.

Para a amplificação do gene 16S rADN das bactérias seguiu-se a técnica descrita por Suzuki, Sasaki, Uramoto, Nakase e Komagata (1996) em que foram utilizados os oligonucleótidos universais (primers) 27F e 1492R (Tabela 6). A PCR realizou-se com o “kit” Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) num volume final de 100 µl contendo (MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM; 0,5 µM de cada primer; 1,4 U de Taq DNA

Polimerase; 100 ng de DNA cromossômico). O programa de amplificação utilizado no termociclador 2720 (Applied Biosystems, USA) foi de 30 ciclos de desnaturação, 94°C durante 60 segundos; hibridação a 55°C durante 150 segundos; e extensão a 72°C durante 150 segundos.

Para a amplificação do gene 26S rADN das leveduras seguiu-se a técnica descrita por Kurtzman e Robnett (1997) em que foram utilizados os oligonucleótidos universais (primers) NL-1 e NL-4 (Tabela 6). A PCR realizou-se com o mesmo “kit” que foi usado para as bactérias, em que as concentrações de ADN cromossômico também foram iguais. O programa de amplificação utilizado no termociclador 2720 (Applied Biosystems, USA) foi de 36 ciclos de desnaturação, 94°C durante 1 minuto; hibridação a 52°C durante 1 minuto; e extensão a 72°C durante 2 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) no tampão TAE 1X, 100 V durante 30 min (BioRad, USA), após coloração com brometo de etídeo. A eletroforese realizou-se num sistema de eletroforese horizontal convencional (BioRad, USA). O ADN foi visualizado sob luz ultravioleta e para a captação da imagem foi utilizado o sistema GelDoc XR (BioRad, USA). Para a purificação do ADN utilizou-se o “kit” comercial Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences). A sequenciação dos fragmentos purificados foi realizada pela empresa Macrogen. As diferentes sequências foram estudadas com o pacote informático DNASTAR e as sequências finais foram comparadas com as existentes na base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Tabela 6. Oligonucleótidos universais.

Gene	Oligonucleótidos iniciadores	Sequências (5'-3')	Dimensão
16S	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1465pb
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	1464pb
26S	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	579pb
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	579pb

3.7. Seleção de estirpes para uso industrial

O objetivo foi o de obter culturas mistas, compostas por estirpes representantes das diferentes espécies identificadas em cada uma das localidades de onde se recolheram amostras de *omavele*. As estirpes foram selecionadas com base na origem, no ano de colheita, no meio de

isolamento e na espécie determinada pela sequenciação do gene 16S rADN para bactérias e do gene 26S rADN para leveduras, de forma que cada fermento tivesse como mínimo uma estirpe de lactobacilos, uma de lactococos e uma de leveduras. Uma das condições era a de as estirpes selecionadas terem que ser diferentes, o que foi posteriormente confirmado pelos resultados obtidos através da Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) realizada no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Biociências da Universidade Autônoma de Barcelona.

De acordo com as condições definidas constituíram-se três tipos de fermentos que foram designados por FO1, FO2 e FO3 conforme mostram as tabelas 7, 8 e 9, respetivamente.

O fermento FO1 foi constituído por estirpes de *Lb. plantarum/Lb. pentosus*, *Lb. helveticus/Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. lactis*, *Issatchenkia orientalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kazachstania unispora*, isoladas de amostras de *omavele* recolhidas em 2009 na localidade de Toco, com exceção da estirpe de *Lc. lactis*.

O fermento FO2 foi constituído por estirpes de *Lb. plantarum/Lb. pentosus*, *Lb. casei/Lb. paracasei*, *Lc. lactis* e *I. orientalis* isoladas de amostras de *omavele* recolhidas em 2010 na localidade de Chibia e por uma estirpe de *S. cerevisiae* isolada de amostras de *omavele* recolhidas em 2009 na mesma localidade.

O fermento FO3 foi constituído por estirpes de *Lb. plantarum/Lb. pentosus*, *S. cerevisiae*, *K. unispora*, *Lc. lactis* e *I. orientalis* isoladas de amostras de *omavele* recolhidas na localidade de Rio da Areia, as três primeiras em 2009 e as restantes em 2010.

Tabela 7. Estirpes utilizadas para a produção do FO1 (TOCO).

Estirpes	Designação
<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	2009 – RGSA 16-4
<i>Lb. helveticus/Lb. plantarum</i>	2009 – KAA 15-1
<i>Lb. casei</i>	2009 – RGSA 7-2
<i>Lc. lactis</i> (Chibia)	2009 – KAAA 21-2
<i>S. cerevisiae</i>	2009- RB-14-5
<i>I. orientalis</i>	2009 – RB 7-5
<i>K. unispora</i>	2009 – RB 15-4

Tabela 8. Estirpes utilizadas para a produção do FO2 (CHIBIA).

Estirpes	Designação
<i>Lb. plantarum /Lb. pentosus</i>	2010 – KAA 9-1
<i>Lb.casei /Lb.paracasei</i>	2010 – M17 9-3
<i>Lc. lactis</i>	2010 – M17 10-1
<i>I. orientalis</i>	2010 – RB 10-1
<i>S. cerevisiae</i>	2009 – RB 20-4

Tabela 9. Estirpes utilizadas para a produção do FO3 (RIO DA AREIA).

Estirpes	Designação
<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	2009 – RGSA 1-1
<i>Lc. lactis</i>	2010 – M17 1-1
<i>S. cerevisiae</i>	2009 – RB 12-1
<i>I. orientalis</i>	2010 – RB 1-1
<i>K. unispora</i>	2009 – RB 9-5

3.8. Produção de *omavele* na oficina tecnológica

A produção de *omavele* foi realizada no CERPTA. No nosso ensaio usou-se leite de vaca previamente submetido à temperatura de 90°C durante 90 segundos. Os recipientes usados para a produção de *omavele* eram de polietileno, os quais foram previamente lavados e desinfetados com ácido peracético a 1% e enxaguados com água esterilizada. Foram feitas 2 produções de cada um dos leites fermentados, com um intervalo de 30 dias entre cada uma delas.

A cada 4 litros de leite de vaca adicionou-se 120 mL de leite de vaca esterilizado com cada um dos fermentos em estudo – FO1, FO2 e FO3 – para obtenção do *Omavele* 1 (O1), do *Omavele* 2 (O2) e do *Omavele* 3 (O3), respetivamente.

Na Tabela 10 estão representadas as concentrações dos microrganismos (\log_{10} ufc/mL) em 120 mL de cada um dos fermentos – FO1, FO2 e FO3 – usados tanto na primeira como na segunda produção dos leites fermentados O1, O2 e O3.

Cada porção de leite inoculada com o fermento (4 L+120 mL) foi incubada a 30 °C durante 10-12 h. Após o período de incubação os leites foram batidos durante cerca de 5 minutos.

Depois deste procedimento os três leites fermentados (O1, O2 e O3) foram introduzidos numa camara de refrigeração à temperatura de 4 °C até ao 30º dia.

Na tabela 11 são referidas as concentrações dos três grupos de microrganismos – lactobacilos, lactococos e leveduras – nos leites inoculados com os fermentos já referidos, na primeira e na segunda produção dos *omaveles* O1, O2 e O3.

Tabela 10. Concentração de microrganismos (\log_{10} ufc/mL) em 120 mL de cada um dos fermentos – FO1, FO2 e FO3 – na primeira e na segunda produção de *omavele*.

	<i>Lb. plantarum/ Lb. pentosus</i>	<i>Lb. helveticus/ Lb. plantarum</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. casei/Lb. paracasei</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>K. unispora</i>	<i>I. orientalis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
FO1 1ª P	8,37	8,03	9,21		8,63	8,34	8,25	8,50
2ª P	7,08	7,76	8,32		8,93	8,21	8,31	7,67
FO2 1ª P	8,19			7,46	7,95		8,67	8,46
2ª P	7,22			7,16	7,36		8,59	8,20
FO3 1ª P	8,13				8,95	8,66	8,40	8,61
2ª P	7,37				7,20	8,43	8,47	8,06

P-produção

Tabela 11. Concentração (\log_{10} ufc/mL) dos 3 grupos de microrganismos nos leites - O1, O2 e O3 – na primeira e na segunda produção de *omavele*, antes da fermentação.

		<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	Leveduras
O1	1ª P	7,77	7,10	7,33
	2ª P	6,93	7,40	7,09
O2	1ªP	6,74	6,43	7,36
	2ªP	5,97	5,84	7,22
O3	1ªP	6,60	7,44	8,85
	2ªP	5,85	5,68	8,75

3.9. Avaliação sensorial das três produções de *omavele*

Os leites fermentados O1, O2 e O3, foram avaliados organolepticamente no dia em que foram produzidos. A avaliação organoléptica foi feita por um painel de provadores constituído por 10 peritos do CERPTA. Avaliou-se o cheiro (láctico, leveduras e outros), o sabor (ácido, amargo,

ácido acético/vinagre e outros) e a textura (granulada, fina). Os resultados foram anotados numa escala de 1 a 7, conforme a ficha de avaliação que consta no Anexo 3.

3.10. Avaliação microbiológica das três produções de *omavele*

Os leites fermentados O1, O2 e O3 foram avaliados em termos microbiológicos através da contagem de *Lactobacillus* em MRS Agar, de *Lactococcus* em M17 Agar e de Leveduras em meio Sabouraud Agar. As contagens dos microrganismos foram feitas no dia da produção do *omavele* (dia 1º) e ao 15º e 30º dias pós-produção, com o objetivo de avaliar o comportamento dos microrganismos presentes ao longo dos trinta dias.

3.11. Análise estatística

A variável resposta analisada (y) foi o logaritmo de base 10 das contagens bacterianas para cada uma das 7 variáveis (Lactobacilos, Lactococos, Leveduras, Aeróbios Totais a 30°C, Micrococos, Enterococos e Enterobactérias) considerando a totalidade da amostra e dividindo-a por ano e por localidade. Este procedimento permitiu normalizar a variável analisada (Anexo 1). Para o factor ano foram considerados 4 níveis (2007, 2008, 2009 e 2010) e para o factor localidade foram considerados 6 níveis (Chibia, Huíla, Humpata, Mulondo, Rio da Areia e Toco). A interação entre ambos os fatores não foi considerada. As diferenças entre as médias foram examinadas através do teste post-hoc HSD de Tukey.

A análise de dados foi realizada com recurso ao *software* estatístico R, versão 2.15.0.

Para avaliarmos o efeito dos fatores ano e localidade nas sete variáveis recorreu-se à ANOVA *two-way* em que o modelo de análise foi $y = \mu + \text{ano} + \text{localidade} + \text{erro}$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Composição química do *omavele*

A composição química dos leites fermentados depende do próprio leite, do metabolismo específico das bactérias que se vão desenvolvendo no mesmo, do local ou da região onde é produzido e do processo de fabrico (El Baradei *et al.*, 2008), além da raça dos animais, da sua alimentação e da frequência da ordenha.

Os parâmetros avaliados revelaram valores semelhantes, independentemente da localidade, embora não se tenha feito uma análise estatística (Tabela 12).

Tabela 12. Composição química de amostras de *omavele*.

Amostra	pH	Gordura (%)	Humidade (%)	Proteína (%)	Sólidos totais (%)	Local
1	4,73	4,53	86,18	4,34	13,82	R. Areia
2	4,43	7,35	83,45	5,93	16,55	R. Areia
3	4,54	6,26	84,74	6,24	15,26	R. Areia
4	4,86	6,83	83,68	6,35	16,32	Toco
5	4,56	4,20	85,98	7,41	14,02	Toco
6	4,72	2,20	88,24	4,64	11,77	Toco
7	4,46	3,08	87,91	4,87	12,09	Toco
8	4,75	6,48	83,15	5,72	16,85	Humpata
9	4,32	4,86	86,02	6,18	13,98	Humpata
10	4,49	5,07	85,28	6,07	14,72	Humpata
11	4,29	4,07	85,41	6,71	14,59	Chibia
12	4,77	5,93	85,55	4,28	14,45	Chibia
13	4,31	4,86	85,74	4,86	14,26	Chibia
14	4,88	6,89	84,90	3,74	15,10	Huíla
15	4,60	4,93	86,29	5,54	13,71	Huíla

O valor de pH oscilou entre 4,88 e 4,29, sendo o valor médio de 4,57. Estes valores foram semelhantes aos do leite fermentado *amasi* produzido na África do Sul e Zimbabwe e superiores aos obtidos nos leites fermentados *ititu*, *nono*, *zabady*, *rayeb* e *lben*, o que pode ser devido a diferenças no modo de produção artesanal dos mesmos e à composição química do leite (Bille, 2009).

Os valores de gordura apresentaram uma grande variabilidade tendo oscilado entre 2,20% e 7,35%, sendo o valor médio de 5,17%, superior ao do leite *laban* (3,1%) consumido no Bahrain (Golfo Pérsico) (Musaiger, Al-Saad, Al-Hooti & Khunji, 1998), ao do *robe* (1,9%) (Sulieman *et al.*, 2009), ao do *zabady* (3,62%) e ao do *nono* (0,83%) (Bille, 2009) e inferior ao do *ititu* (9,1%) (Gonfa *et al.*, 2001) e do *amasi* (5,89%) (Bille, 2009).

Os valores da proteína variaram entre 3,74% e 7,41% com uma média de 5,53%, superior aos leites *laban* (3,5%), *robe* (3,3%), *amasi* (4,57%), *zabady* (4,17%) e *nono* (2,55%) e inferior ao do *ititu* (7,17%) (Gonfa *et al.*, 2001). Os teores de proteína do *omavele* são aceitáveis tendo em conta que o leite foi obtido a partir de bovinos de raça autóctone, o que representa uma vantagem do ponto de vista nutricional e industrial.

Quanto aos sólidos totais, oscilaram entre 11,77% e 16,85% com uma média de 14,50%, valor esse superior ao do *robe* (7,2%) (Sulieman *et al.*, 2009), ao do *laban* (11,8%) (Musaiger *et al.*, 1998) e aos valores referidos por Bille (2009) no *nono* (6,08%) e no *zabady* (14,32%) e inferior ao do *amasi* (16,53%). Gonfa *et al.* (2001) referiram no *ititu* valores superiores (20,87%). O teor de humidade foi inferior ao do *laban* (88,2%) (Musaiger *et al.*, 1998).

Apesar da diversidade de fatores que influenciam a composição química dos leites fermentados verificámos que aquela composição no *omavele* era semelhante à de outros leites produzidos em África, podendo considerar-se mais rico nutricionalmente que o leite *nono*.

4.2. Teores de microrganismos isolados de amostras de *omavele*

Em amostras de *omavele* obtidas nos diferentes anos as contagens médias (\log_{10} ufc/mL) de Lactobacilos revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os anos 2007:2008 e 2007:2009; as de Lactococos revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os anos 2007:2009; as de Leveduras revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os anos 2007: 2010; as de Enterococos revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os anos 2007:2010 e 2009:2010; as de Enterobactérias revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os anos 2008:2010 e 2009:2010. Não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para Micrococos e Aeróbios Totais a 30°C, nos anos em estudo (Tabela 13) (Anexo 1).

As diferenças obtidas entre os anos em estudo para Lactobacilos, Lactococos, Leveduras e Enterococos, podem ser devidas a situações relacionadas com o clima, uma vez que em

2007 as amostras foram colhidas durante a estação das chuvas, enquanto em 2008, 2009 e 2010 foram colhidas no fim da estação das chuvas e início da estação seca. No entanto, para o caso de Enterococos e Enterobactérias, verificaram-se diferenças significativas em amostras colhidas na mesma época durante os anos 2009:2010, 2008:2010 e 2009:2010. Neste caso as diferenças registadas podem ser devidas a aspectos relacionados com a qualidade higiénica da matéria-prima e a elaboração do produto.

Tabela 13. Teores médios (\log_{10} ufc/mL) dos diferentes microrganismos presentes no *omavele* obtidos nos diferentes anos.

Microrganismos	Anos			
	2007	2008	2009	2010
Lactobacilos	7.38 ^a	6.59 ^b	6.46 ^b	6.92 ^{a,b}
Lactococos	6.77 ^a	6.55 ^{a,b}	5.90 ^b	6.18 ^{a,b}
Leveduras	6.39 ^a	6.04 ^{a,b}	5.70 ^{ab}	5.52 ^b
Enterococos	4.07 ^b	4.85 ^{a,b}	4.10 ^b	5.02 ^a
Micrococos	4.07 ^a	3.36 ^a	3.33 ^a	4.03 ^a
Enterobactérias	—	2.69 ^b	2.91 ^b	4.42 ^a
Aeróbios totais a 30°C	—	6.79 ^a	6.29 ^a	6.17 ^a

As médias com os mesmos índices não diferem significativamente ($p < 0,05$).

Em amostras de *omavele* obtidas nas diferentes localidades as contagens médias de microrganismos (\log_{10} ufc/mL) revelaram a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) para: Lactococos entre Humpata e Rio da Areia e Humpata e Toco; Enterococos entre Huíla e Toco, Huíla e Rio da Areia, Humpata e Toco e Humpata e Rio da Areia; Enterobactérias entre Toco e Huíla; e Aeróbios totais a 30 °C entre Humpata e Rio da Areia e Humpata e Toco. Não se verificaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para Lactobacilos, Leveduras e Micrococos (Tabela 14) (Anexo 1).

Estas diferenças podem ser devidas a várias situações como: as condições climatéricas inerentes a cada localidade; a idade dos recipientes utilizados na preparação do *omavele*, particularmente da cabaça, uma vez que quanto mais antigo for o recipiente maior é a quantidade de leite residual acumulada nas paredes, proporcionando assim um ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos; a quantidade de *omavele* da produção anterior que é usada como cultura de arranque e as condições sanitárias do processo de produção. As cascas ou raízes de

várias plantas, que podem ou não ser adicionadas ao leite com o objetivo não só de acelerar a coagulação mas também de conferir odores e sabores diferentes, podem funcionar como fonte de microrganismos e assim contribuir para as diferenças microbianas encontradas.

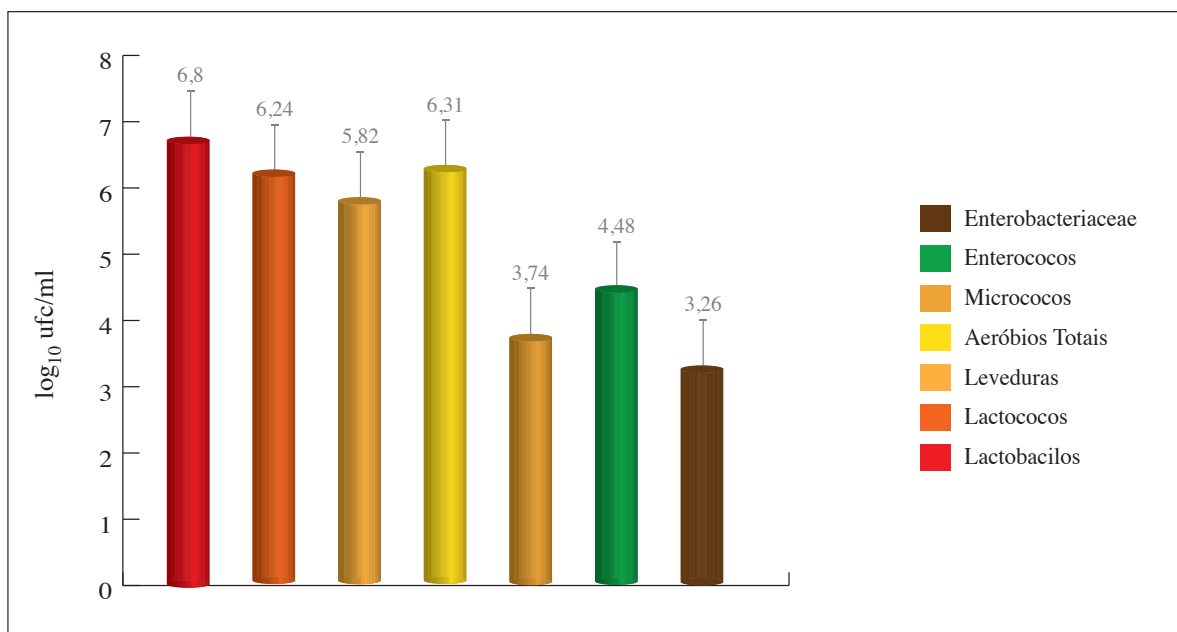
Tabela 14. Teores médios (\log_{10} ufc/mL) dos diferentes microrganismos presentes no *omavele* obtidos nas diferentes localidades.

Microrganismos	Localidades					
	Rio da Areia	Mulondo	Chibia	Humpata	Toco	Huíla
Lactobacilos	6.45 ^a	7.23 ^a	6.94 ^a	7.12 ^a	6.58 ^a	7.17 ^a
Lactococos	5.77 ^b	6.70 ^{a,b}	6.43 ^{a,b}	7.06 ^a	5.77 ^b	6.56 ^{a,b}
Leveduras	5.65 ^a	6.42 ^a	5.80 ^a	6.08 ^a	5.64 ^a	5.70 ^a
Enterococos	3.85 ^b	4.17 ^{a,b}	4.69 ^{a,b}	5.45 ^a	4.11 ^b	5.83 ^a
Micrococos	3.27 ^a	4.23 ^a	4.12 ^a	3.90 ^a	3.35 ^a	3.84 ^a
Enterobactérias	3.08 ^{ab}	_____	3.19 ^{ab}	_____	2.69 ^b	4.60 ^a
Aeróbios totais a 30°C	6.13 ^b	_____	6.46 ^{ab}	7.31 ^a	5.83 ^b	6.34 ^{a,b}

As médias com os mesmos índices não diferem significativamente ($p < 0,05$).

A microbiota láctea presente no *omavele* encontra-se representada na Figura 11. Verificou-se que não foi registada uma grande variabilidade ao longo dos quatro anos mantendo-se a tendência de Lactobacilos > Lactococos > Leveduras > Enterococos > Micrococos > Enterobactérias, confirmada por estudos realizados por vários autores em produtos lácteos fermentados tradicionais (Beukes *et al.*, 2001; Gonfa *et al.*, 2001; Mathara *et al.*, 2004; Obodai & Dodd, 2006).

Figura 11. Teores médios dos diferentes microrganismos isolados em amostras de *omavele* durante o período em estudo.



De acordo com Narvhus e Gadaga (2003) os leites naturalmente fermentados produzidos em África apresentam, geralmente, teores de bactérias lácticas e de bactérias aeróbias mesófilas superiores a $9 \log_{10}$ ufc/g, teores de coliformes de $6-7 \log_{10}$ ufc/g e de leveduras de $6 \log_{10}$ ufc/g. Os mesmos autores referem que no leite fermentado *amasi*, produzido no Zimbabwe, os teores médios de bactérias lácticas, leveduras e de coliformes foram de $8 \log_{10}$ ufc/mL, $> 6 \log_{10}$ ufc/mL e $5-6 \log_{10}$ ufc/mL, respetivamente.

Mathara *et al.* (2004) referem que lactobacilos e lactococos foram as bactérias lácticas mais frequentes em amostras de leite fermentado *kule naoto* no Kenya, em que os teores médios obtidos foram de $8,0 \log_{10}$ ufc/mL e de $7,9 \log_{10}$ ufc/mL, respetivamente. Estes valores foram superiores aos obtidos no *omavele* (Fig. 11).

Estudos realizados no Ghana por Obodai e Dodd (2006) em leite fermentado *nyarmie* revelaram que as concentrações de lactococos eram de 10^8 ufc/mL, as de lactobacilos eram de 10^{10} ufc/mL e as de bolores e leveduras de 10^7 ufc/mL, mais elevados que os obtidos no nosso estudo (Fig.11).

Segundo Narvhus e Gadaga (2003) o teor de leveduras em produtos lácteos fermentados tradicionais pode ser superior a $8 \log_{10}$ ufc/g. No decorrer do nosso estudo não foram registadas concentrações de bolores e leveduras superiores a 10^6 ufc/mL.

Abdelgadir *et al.* (2001), em amostras de leite fermentado *rob* produzido no Sudão, referem teores de lactobacilos de $8,85-8,96 \log_{10}$ ufc/mL, de lactococos de $8,80-8,89 \log_{10}$ ufc/mL, de leveduras de $7,19-7,64 \log_{10}$ ufc/mL e de microrganismos aeróbios mesófilos de $5,53-6,57 \log_{10}$ ufc/mL, estes resultados foram superiores aos obtidos no nosso estudo, com exceção de

microrganismos aeróbios totais a 30°C em que no *omavele* os teores médios obtidos variaram entre 5 e 8,01 log₁₀ ufc/mL.

Isono, Shingu e Shimizu (1994), em estudos realizados em leites fermentados produzidos no norte da Tanzânia, obtiveram teores médios de leveduras de 6,0-8,0 log₁₀ ufc/mL, valores superiores aos teores médios encontrados no *omavele* (5,82 log₁₀ ufc/mL) conforme se pode ver na figura 11.

Akabanda *et al.* (2010), em leite fermentado *nunu*, obtiveram ao fim de 12 horas de fermentação teores de bactérias lácticas de 6,43±0,44 log₁₀ ufc/mL, de leveduras de 6,27±0,85 log₁₀ ufc/mL e de aeróbios totais a 30°C de 6,92±0,77 log₁₀ ufc/mL. Embora os autores não tenham feito distinção entre as contagens médias das diferentes BAL, podemos constatar que os teores médios daquelas bactérias no *nunu* foram inferiores aos obtidos no *omavele* (lactobacilos 6,80 log₁₀ ufc/mL, lactococos 6,24 log₁₀ ufc/mL e enterococos 4,48 log₁₀ ufc/mL). O mesmo não aconteceu em relação aos teores médios de leveduras e aeróbios totais, que no *nunu* foram superiores ao encontrado no *omavele* (leveduras 5,82 log₁₀ ufc/mL e aeróbios totais a 30 °C 6,31 log₁₀ ufc/mL) (Fig. 11).

Estudos realizados por Gadaga *et al.* (2000), em amostras de leite acidificado colhidas em algumas residências na África do Sul, referem contagens de leveduras de 10³-10⁶ ufc/mL. Os teores médios de bolores e leveduras obtidos em leites fermentados *ititu* e *meomata* produzidos na Etiópia foram de 6,18 log₁₀ ufc/mL e de 5,8 log₁₀ ufc/mL, respectivamente. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos no *omavele* e inferiores aos obtidos no leite fermentado *nono* produzido na Nigéria, no qual os teores de leveduras foram de 1,5x10⁷ ufc/g (Bankole & Okagbue, 1992). No entanto Okonkwo (2011), num outro estudo realizado em amostras de *nono* consumido na região norte da Nigéria, obteve teores médios de bolores e de leveduras de 1,23 log₁₀ ufc/mL, muito inferiores aos obtidos no nosso estudo.

Na Namíbia, Bille, Buys e Taylor (2007) obtiveram em leite fermentado em cabaças teores médios de aeróbios totais a 30°C de 1,58 x 10⁸ ufc/mL, de lactobacilos de 1,53 x 10⁸ ufc/mL, de lactococos de 2,1 x 10⁸ ufc/mL, de leveduras de 7,39 x 10⁶ ufc/mL e de enterobactérias de 5,8 x 10⁴ ufc/mL, valores superiores aos obtidos no *omavele*. De acordo com os autores, é presumível que o ambiente ácido favoreça a predominância de bactérias lácticas nos leites estudados.

No leite fermentado *fulani* do Burkina Faso foram detetados teores médios de aeróbios totais a 30°C de 6,71 x 10⁷ ufc/mL, de lactobacilos mesófilos de 24,44 x 10⁶ ufc/mL, de lactococos 7,75 x 10⁷ ufc/mL, de enterobactérias de 0,98 x 10⁴ ufc/mL e de bolores e leveduras de 2,6 x 10⁴ ufc/mL (Savadoغو *et al.*, 2004). Estes resultados foram, em parte, semelhantes aos obtidos no *omavele*, com exceção dos de leveduras que foram inferiores aos obtidos no *omave-*

le. Os mesmos autores obtiveram concentrações de bactérias lácticas entre $2,4 \times 10^4$ ufc/mL e $3,9 \times 10^8$ ufc/mL em que as contagens mais altas foram superiores às obtidas no nosso estudo (lactobacilos $6,80 \log_{10}$ ufc/mL, lactococos $6,24 \log_{10}$ ufc/mL e enterococos $4,48 \log_{10}$ ufc/mL) embora o autor não tenha feito distinção entre as contagens médias das diferentes BAL. As contagens médias de bolores e leveduras observadas em leite fermentado *ergo* colhido no Sul da Etiópia excederam $8 \log_{10}$ ufc/mL, muito mais elevados do que o valor aceitável (< 10 ufc/g para o iogurte) (Yilma, 2012).

Estudos realizados por Yu *et al.* (2011), em leites fermentados consumidos na Mongólia, revelaram teores médios de BAL entre $4,85$ e $8,54 \log_{10}$ ufc/mL em leite de vaca fermentado, em que o teor médio mais elevado foi superior ao obtido no nosso estudo (lactobacilos $6,80 \log_{10}$ ufc/mL, lactococos $6,24 \log_{10}$ ufc/mL e enterococos $4,48 \log_{10}$ ufc/mL), embora o autor não tenha feito distinção entre as contagens médias das diferentes BAL. Por outro lado Watanabe *et al.* (2008), em leite fermentado de vaca *tarag* consumido na Mongólia, reportaram teores médios de bactérias lácticas de $8,35 \pm 0,62 \log_{10}$ ufc/mL que são superiores aos obtidos no *omavele*, enquanto os resultados de bolores e leveduras $5,86 \pm 1,29 \log_{10}$ ufc/mL foram semelhantes aos obtidos no nosso estudo.

O teor de aeróbios totais a 30°C é um bom indicador de higiene, porque permite controlar as práticas de higiene durante a produção, colheita e manipulação do leite cru, embora se tenha que ter em consideração que os produtos fermentados naturalmente apresentam contagens elevadas destes microrganismos devido à presença das BAL.

Um estudo realizado na Mongólia por Shuangqua *et al.* (2006), sobre a microbiota presente numa cultura de arranque *hurunge* utilizada pelos pastores para a produção de leites fermentados, revelou concentrações de bactérias lácticas entre $1,8 \times 10^5$ e $5,3 \times 10^8$ ufc/g e de leveduras entre $6,1 \times 10^5$ e $3,3 \times 10^6$ ufc/g, o que não foi diferente dos valores obtidos por Yu *et al.* (2011).

Abd El-Salam (2002) referiu que o teor de bactérias lácticas presentes no leite fermentado *zabady* variava entre 1×10^8 e 7×10^8 ufc/mL, e que eram semelhantes aos padrões requeridos para o iogurte. Contudo, continha um grande número de bolores e leveduras ($5,0 \times 10^4$ - $6,9 \times 10^5$ ufc/mL), o que podia ser atribuído a uma contaminação adicional do leite a partir do meio ambiente onde era colocado, pois normalmente ficava descoberto durante o período de incubação. Os teores de bactérias lácticas acima referidos foram superiores aos obtidos no *omavele* (lactobacilos $6,80 \log_{10}$ ufc/mL, lactococos $6,24 \log_{10}$ ufc/mL e enterococos $4,48 \log_{10}$ ufc/mL), embora o autor não tenha feito distinção entre as contagens médias das diferentes BAL; já os teores de leveduras no *omavele* variaram entre $2,64$ e $7,24 \log_{10}$ ufc/mL.

Abd El Gawad *et al.* (2010) reportaram teores médios de bactérias lácticas entre 10^6 e 10^7 ufc/mL e de bolores e leveduras de 10^2 ufc/mL. Os teores médios de bactérias lácticas foram semelhantes aos obtidos no *omavele* (lactobacilos $6,80 \log_{10}$ ufc/mL, lactococos $6,24 \log_{10}$ ufc/mL e enterococos $4,48 \log_{10}$ ufc/mL), embora o autor não tenha feito distinção entre as contagens médias das diferentes BAL, enquanto os de bolores e leveduras foram inferiores aos obtidos no *omavele* ($5,82 \log_{10}$ ufc/mL).

Dewan e Tamang (2007) referiram, em leites fermentados artesanais produzidos nos Himalaias, elevados teores de BAL, os quais variaram entre $7,4 \times 10^7$ ufc/g e $8,7 \times 10^8$ ufc/g, e teores de leveduras de 10^7 ufc/g, superiores aos encontrados no nosso estudo. Do mesmo modo, estudos realizados por Al-Otaibi (2012) em leite fermentado *sameel* consumido na região leste da Arábia Saudita, revelaram teores médios de lactobacilos, lactococos, leveduras, enterococos e enterobactérias, de $7,4 \log_{10}$ ufc/mL, $7,7 \log_{10}$ ufc/mL, $5,7 \log_{10}$ ufc/mL, $5,9 \log_{10}$ ufc/mL, $< 2 \log_{10}$ ufc/mL, respectivamente. Os teores das BAL foram superiores aos do *omavele* enquanto os de leveduras e enterobactérias foram inferiores aos obtidos no nosso estudo.

Saleh (2013), ao estudar o leite fermentado *laban zeer* no Egito, obteve teores médios de BAL de $7,4 \pm 0,49 \log_{10}$ ufc/g e de leveduras de $4,67 \log_{10}$ ufc/g, semelhantes aos obtidos por Al-Otaibi (2012), mas superiores aos obtidos no nosso estudo com exceção de leveduras. De acordo com o autor o teor de bactérias mesófilas aeróbias foi inferior ao das BAL, à semelhança do que ocorreu no *omavele*.

Yilma e Faye (2006), em amostras de *ergo* colhidas em diferentes produtores da Etiópia, obtiveram contagens médias de BAL de $7,68 \log_{10}$ ufc/mL e de aeróbios totais a 30°C entre $7,71 \log_{10}$ ufc/mL e $10 \log_{10}$ ufc/mL, superiores às obtidas no nosso estudo (lactobacilos $6,80 \log_{10}$ ufc/mL, lactococos $6,24 \log_{10}$ ufc/mL, enterococos $4,48 \log_{10}$ ufc/mL, aeróbios totais a 30°C $6,31 \log_{10}$ ufc/mL) embora os autores não tenha feito distinção entre as contagens médias das diferentes BAL.

O teor médio de enterococos obtido no *omavele* ($4,48 \log_{10}$ ufc/mL) durante o período em estudo foi inferior ao obtido por Mathara *et al.* (2004) que foi de $5,5 \log_{10}$ ufc/mL, por Al-Otaibi (2012) que foi de $5,9 \log_{10}$ ufc/mL e superior ao obtido por Benkerroum *et al.* (1984) citado por Benkerroum e Tamime (2004) $1,3 \times 10^3$ ufc/mL. Estes autores consideram que de alguma maneira este grupo de microrganismos tem importância na fermentação dos produtos lácteos.

Apesar da existência de alguma controvérsia, muitos estudos referem a importância dos enterococos na maturação de queijos, devido à sua atividade proteolítica e estereolítica e à produção de compostos aromáticos (diacetilo) a partir do citrato (Floquié Moreno *et al.*, 2006). É por esta razão que são utilizados em culturas de arranque, para a produção de queijos,

principalmente no Sul da Europa. No entanto, também têm sido isolados com frequência em produtos lácteos do Sul da Europa (Giraffa, 2003).

Ao contrário de outras bactérias lácticas os enterococos não são considerados GRAS. Não têm uma importância particular em tecnologia de alimentos, mas apesar disso algumas estirpes de *E. faecium* e de *E. faecalis* podem ser utilizadas como probióticos e como inoculantes em silagem (Ogier & Serror, 2008).

No nosso estudo foram obtidos teores médios de enterobactérias de $3,26 \log_{10}$ ufc/mL, inferiores aos referidos por Mathara *et al.* (2004) com teores entre 4,9 e $9,4 \log_{10}$ ufc/mL, por Savadogo *et al.* (2004) com teores de $0,98 \times 10^4$ ufc/mL e por Yilma, Faye e Loiseau (2007) com teores de $4,7 \pm 0,42 \log_{10}$ ufc/mL.

Benkerroum e Tamime (2004) referem a presença de elevados teores (10^4 ufc/mL) de bactérias fecais (coliformes, *E. coli* e *Streptococcus* do grupo D) no leite fermentado *lben*, resultante da má qualidade sanitária do leite utilizado e da falta de condições de higiene na elaboração do produto.

Gran, Mutukumira, Wetlesen e Narvhus (2002), em leites fermentados artesanalmente no Zimbabwe, referem teores de coliformes de $9,3 \times 10^4$ ufc/mL e de *E. coli* de $5,7 \times 10^4$ ufc/mL, o que também reflete a má qualidade sanitária do leite utilizado e a falta de condições de higiene na elaboração dos mesmos.

Cueto *et al.* (2007), ao estudarem o leite fermentado tradicional *suero costeno* consumido na costa caribenha da Colômbia, obtiveram teores de enterobactérias entre 1×10^1 e 1×10^3 ufc/mL, semelhantes aos obtidos no nosso estudo, tendo ainda verificado que os mesmos foram decrescendo no final do período de fermentação, à medida que diminuía o pH, à semelhança dos resultados obtidos por Al-Otaibi (2012).

El-Baradei *et al.* (2008) e Al-Otaibi (2012) obtiveram contagens de enterobactérias $< 2,0 \log_{10}$ ufc/g, enquanto Saleh (2013) não detetou enterobactérias no leite fermentado *laban zeer* pelo facto de ser um produto com baixo pH (3,7-4,1) e com alguma concentração de sal.

Akabanda *et al.* (2010) obtiveram no leite tradicional fermentado do Gana, após 12 horas de fermentação, teores de enterobactérias de $4,66 \pm 0,65 \log_{10}$ ufc/mL, e constataram que estes teores diminuía com a redução do pH, não tendo detetado enterobactérias ao fim de 48h. Este facto reflete o efeito inibitório do pH, que contribui para a qualidade e segurança dos produtos lácteos fermentados.

Por sua vez, Fergus e Nyati (1990) e Gran *et al.* (2002) verificaram que os teores de *E. coli* e coliformes em dois leites fermentados do Zimbabwe eram elevados no início da fermentação e que posteriormente reduziam. Tem-se observado noutros produtos fermentados a existência

de correlação entre a redução dos teores de coliformes e de *E. coli* e o tempo de fermentação (Simango & Rukure, 1992).

Uzeh, Ohenhen e Rojugin (2006) obtiveram, em leite fermentado *nono* da Nigéria, teores de aeróbios totais ($3,55 \times 10^8$ ufc/mL) e de coliformes ($4,55 \times 10^7$ ufc/mL) que foram superiores aos obtidos no nosso estudo. A elevada contagem de aeróbios totais a 30°C e de coliformes em ambos os produtos pode ser uma consequência da má higiene durante o processamento e venda dos produtos. Isso inclui os manipuladores, qualidade da água utilizada e os utensílios.

Os teores de enterobactérias obtidos no *omavele* (Fig. 11) demonstraram tratar-se de um grupo minoritário, à semelhança do que ocorreu no leite fermentado *fulani* do Burkina-Faso. Este facto pode ser devido não só ao baixo pH do *omavele* (pH 4,5) como também à presença de elevados teores de bactérias lácticas, o que não é favorável ao crescimento das enterobactérias. Apesar do período de fermentação do *omavele* ser de cerca de 9 horas, inferior ao da maioria dos outros leites fermentados artesanalmente referidos na literatura, o pH registado é semelhante ao de outros leites, presumivelmente porque os recipientes utilizados (cabaças) reservam no seu interior uma carga bacteriana elevada, que faz com que o processo de fermentação seja célere e se atinjam valores de pH relativamente baixos num curto intervalo de tempo.

As enterobactérias são consideradas como microrganismos indicadores da segurança microbiológica de alimentos.

De acordo com Bonfoh *et al.* (2003) as elevadas contagens de enterobactérias podem estar relacionadas com a temperatura do local, a falta de higiene, a contaminação dos recipientes e a qualidade da água. No entanto, para o caso particular dos leites fermentados artesanalmente, para além dos fatores referidos o grau de contaminação inicial do leite cru tem uma grande influência (Gran *et al.*, 2002).

Narvhus e Gadaga (2003) referem que a pouca higiene durante o processamento dos produtos lácteos fermentados artesanalmente e a utilização de leite não pasteurizado, têm como consequência a presença de uma grande variedade de microrganismos patogénicos. No entanto, os ácidos orgânicos e os metabolitos produzidos pelas BAL inibem outros microrganismos contaminantes como enterobactérias, constituindo uma vantagem adicional da fermentação (Holzapfel, 2002; Gran *et al.*, 2002; Cueto *et al.*, 2007). Contudo, têm sido detetados enterobactérias nestes produtos, devido provavelmente ao facto das quantidades dos compostos antimicrobianos serem pequenas e por isso não exercerem o efeito inibitório esperado (Gran *et al.*, 2002).

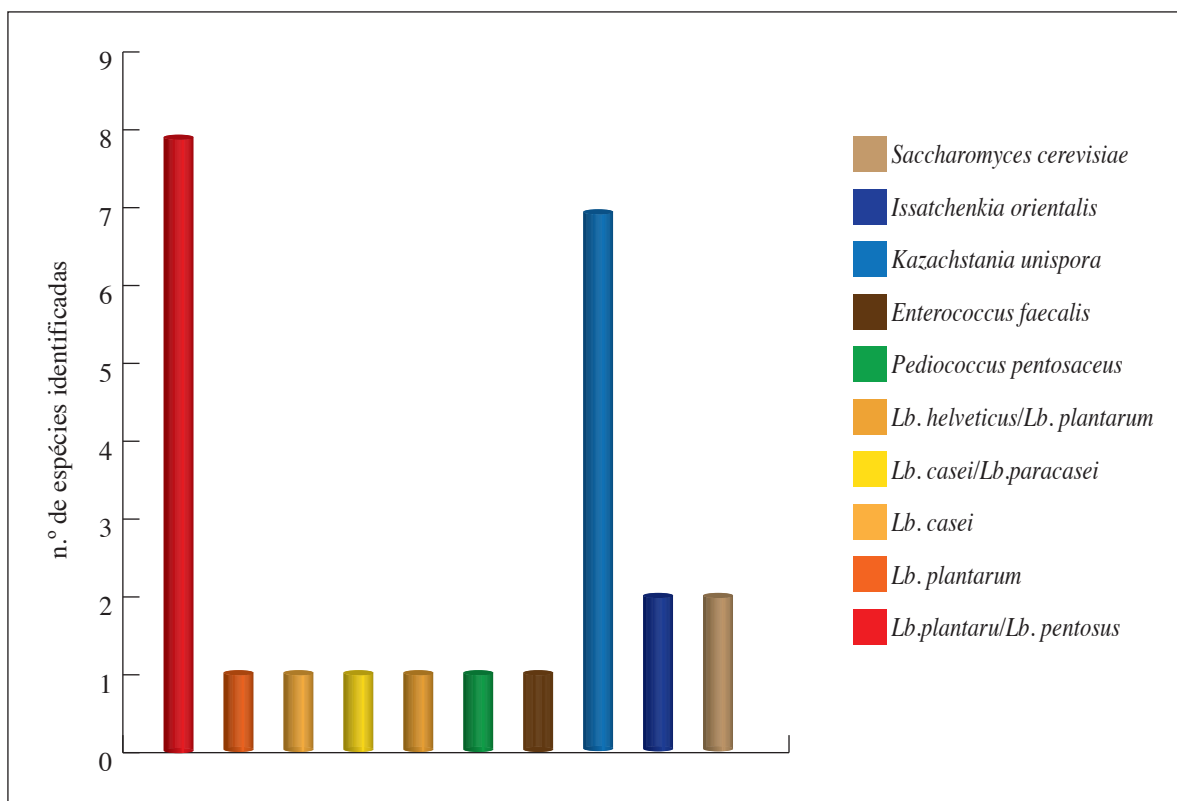
Estudos realizados por Nyatoti, Mtero e Rukure (1997) e por Olasupo, Smith e Akinsinde (2002) revelaram a presença *E. coli* enteropatogénica em amostras de leite acidificado. Olasupo *et al.* (2002) referem ainda a presença de *S. aureus* e *Klebsiela* spp. no leite fermentado *wara* e de *Salmonella* spp. e *Klebsiella* spp. no leite fermentado *nono*.

Segundo Akabanda *et al.* (2010) a adoção de boas práticas de higiene, como por exemplo a limpeza e desinfecção do ubere, são muito importantes na redução da contaminação do leite durante a ordenha.

4.3. Espécies identificadas no *omavele* em cada área de colheita

Os resultados da identificação genotípica dos 141 isolados de amostras de *omavele* recolhidas nas diferentes localidades são referidos nas figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17. No anexo 2, constam os resultados da identificação feita com base na sequenciação.

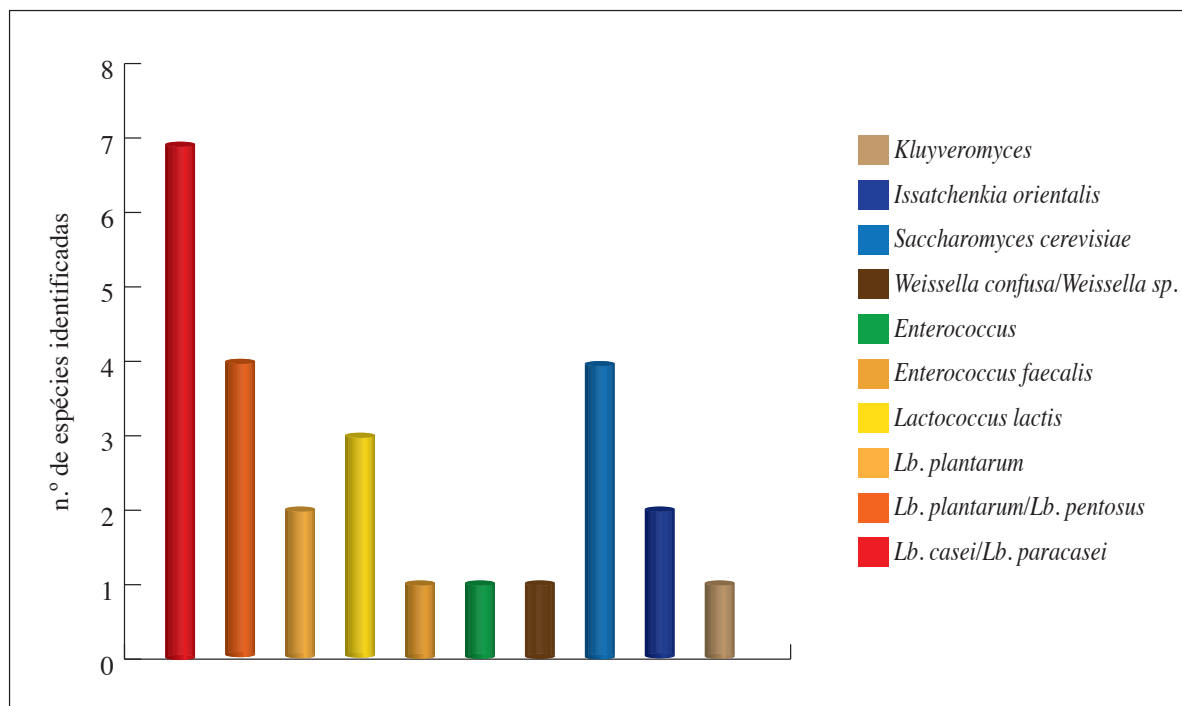
Figura 12. Espécies identificadas em isolados de amostras de *omavele* colhidas na localidade do Toco em 2009 e 2010.



As espécies mais frequentemente identificadas em 25 isolados obtidos a partir de amostras colhidas na localidade do Toco foram *Lb. plantarum/Lb. pentosus* (8) e *Kazachstania unispورا* (7), seguidas de *Issatchenkia orientalis* (2) e de *Saccharomyces cerevisiae* (2), enquanto *Lb. plantarum* (1), *Lb. casei* (1), *Lb. casei/Lb. paracasei* (1), *Lb. helveticus/Lb. plantarum* (1),

Enterococcus faecalis (1) e *Pediococcus pentosaceus* (1) foram as espécies menos frequentemente identificadas. A bactéria láctica predominante foi *Lb. plantarum*/*Lb. pentosus* e a levedura foi *Kazachstania unispora* (Fig. 12).

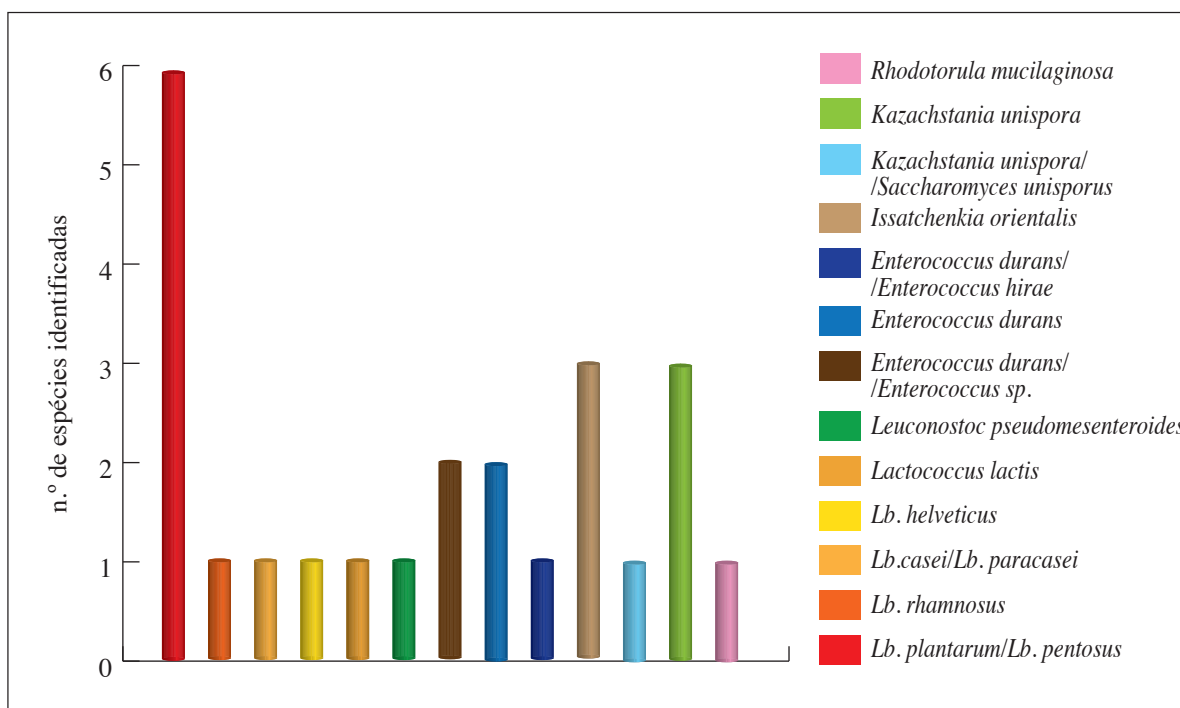
Figura 13. Espécies identificadas em isolados de amostras de *omavele* colhidas na localidade da Chibia em 2007, 2009 e 2010.



Nos 26 isolados de amostras provenientes da localidade da Chibia as espécies mais frequentemente identificadas foram *Lb. casei/Lb. paracasei* (7), *Lb. plantarum/Lb. pentosus* (4), *Saccharomyces cerevisiae* (4) e *Lactococcus lactis* (3) seguidas de *Lb. plantarum* (2), *Issatchenkia orientalis* (2), *Enterococcus faecalis*/sp (2), enquanto *Kluyveromyces marxianus/Kluyveromyces lactis* (1), *Weissella confusa/Weissella sp.* (1) foram as menos frequentemente identificadas (Fig. 13).

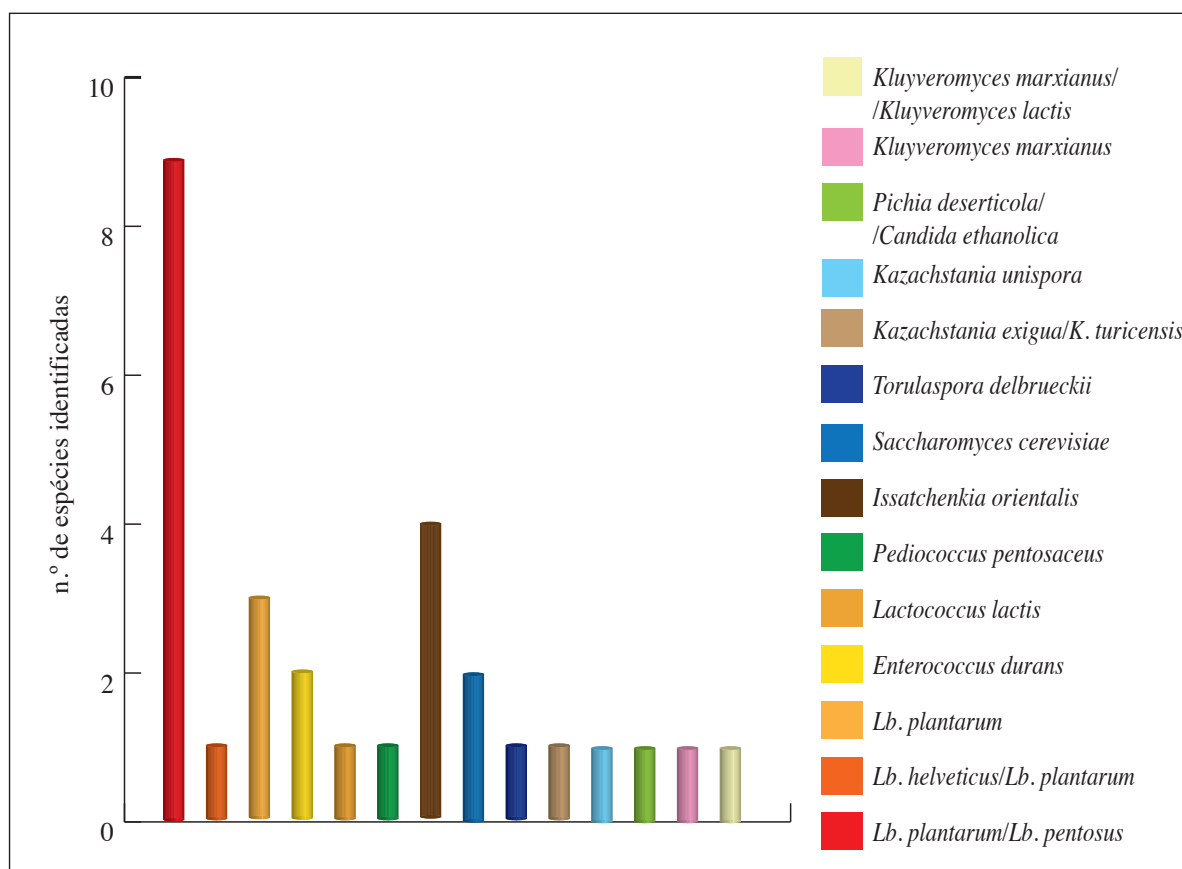
A bactéria láctica predominante foi *Lb. casei/Lb. paracasei*, enquanto *Saccharomyces cerevisiae* foi a levedura mais frequentemente identificada, o que foi diferente das amostras colhidas na localidade de Toco.

Figura 14. Espécies identificadas em isolados de amostras de *omavele* colhidas na localidade da Humpata em 2007, 2009 e 2010.



As espécies predominantes nos 24 isolados de amostras obtidas na localidade de Humpata foram *Lb. plantarum/Lb. pentosus* (6), *Kazachstania unispora* (3), *Issatchenkia orientalis* (3), *Enterococcus durans/Enterococcus sp.* (2), *Enterococcus durans* (2), enquanto as menos frequentemente identificadas foram *Enterococcus durans/Enterococcus hiraе* (1), *Lb. helveticus* (1), *Lb. rhamnosus* (1), *Lb. casei/Lb. paracasei* (1), *Lactococcus lactis* (1), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1), *Rhodotorula mucilaginosa* (1) e *Kazachstania unispora/Saccharomyces unisporus* (1) (Fig. 14). Ao contrário das duas localidades anteriores não foi identificada *Saccharomyces cerevisiae*. Tal como no Toco *Kazachstania unispora* foi a levedura mais frequentemente identificada.

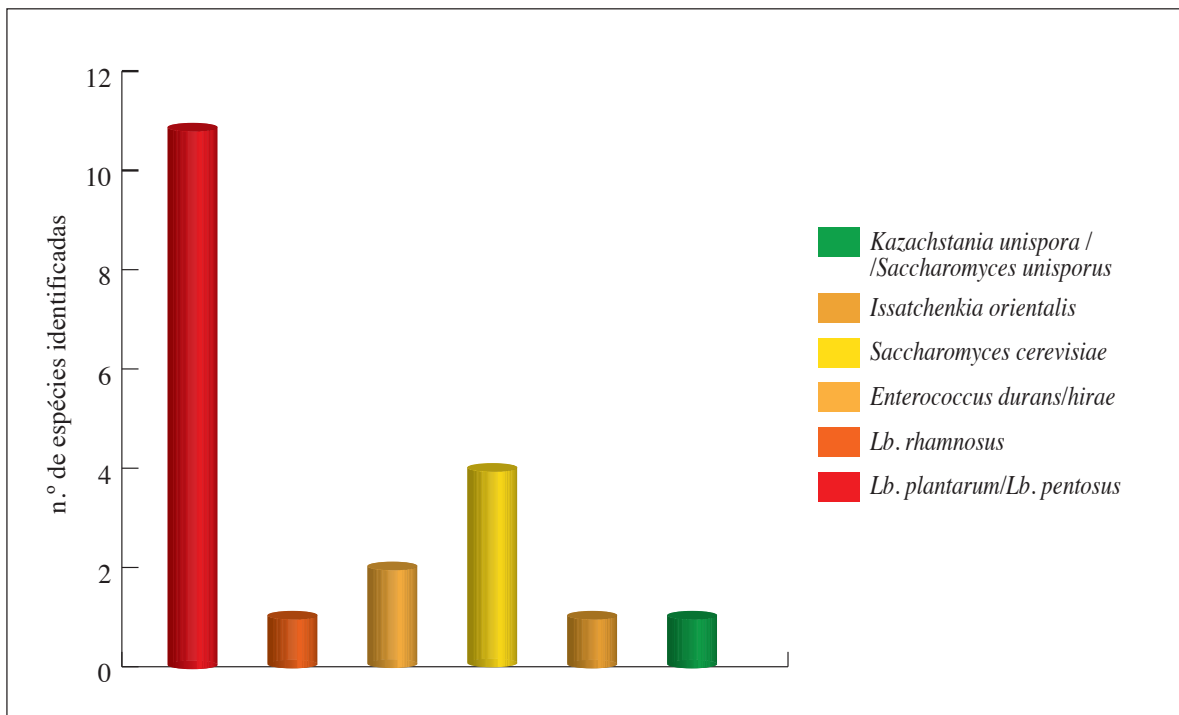
Figura 15. Espécies identificadas em isolados de amostras de *omavele* colhidas na localidade de Rio da Areia em 2007, 2009 e 2010.



Lb. plantarum/Lb. pentosus (9), *Issatchenkia orientalis* (4) e *Lb. plantarum* (3) foram as espécies mais frequentemente identificadas nos 29 isolados de amostras de *omavele* obtidas na localidade de Rio da Areia, enquanto *Saccharomyces cerevisiae* (2), *Enterococcus durans* (2), *Lb. helveticus /Lb. plantarum* (1), *Lactococcus lactis* (1), *Pediococcus pentosaceus* (1), *Kazachstania unispora* (1), *Kazachstania exigua/Kazachstania turicensis* (1), *Kluyveromyces marxianus* (1), *Kluyveromyces marxianus/ Kluyveromyces lactis* (1), *Torulospora delbrueckii* (1) e *Pichia deserticola/Candida ethanolica* (1) foram as menos frequentemente identificadas (Fig. 15). Em Rio da Areia, ao contrário das localidades do Toco e Chibia, a levedura mais frequentemente identificada foi *Issatchenkia orientalis*.

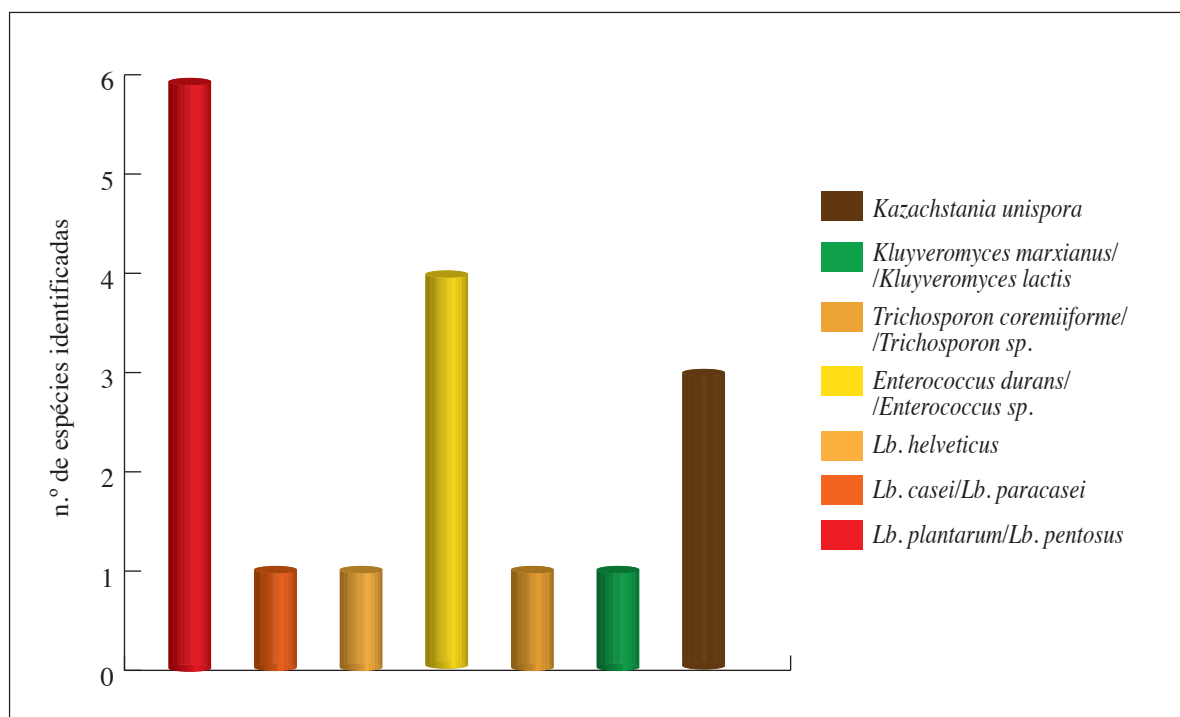
A bactéria láctica predominante foi *Lb. plantarum/Lb. pentosus* tal como na localidade de Humpata (Fig. 14).

Figura 16. Espécies identificadas em isolados de amostras de *omavele* colhidas na localidade de Mulondo em 2007.



Lb. plantarum /Lb. pentosus (11) e *Saccharomyces cerevisiae* (4) foram as espécies predominantes nos 20 isolados de amostras colhidas no Mulondo, seguidas de *Enterococcus durans/Enterococcus hirae* (2). As espécies menos frequentemente isoladas foram *Lb. rhamnosus* (1), *Issatchenkia orientalis* (1) e *Kazachstania unispora/Saccharomyces unisporus* (1) (Fig. 16). Tal como na Chibia *Saccharomyces cerevisiae* foi a levedura predominante.

Figura 17. Espécies identificadas em isolados de amostras de *omavele* colhidas na localidade da Huíla em 2010.



Em 17 isolados de amostras de *omavele* colhidas na Huíla *Lb. plantarum/Lb. pentosus* (6) foram predominates, seguidas de *Enterococcus durans/Enterococcus sp.* (4) e *Kazachstania unispora* (3). As menos frequentemente identificadas foram *Lb. casei/Lb. paracasei* (1), *Lb. helveticus* (1) *Kluyveromyces marxianus/Kluyveromyces lactis* (1) e *Trichosporon coremiforme/Trichosporon sp.* (1) (Fig. 17).

Lb. plantarum/Lb. pentosus foi predominante, tendo sido identificada em todas as amostras obtidas nas localidades objeto do nosso estudo, com maior frequência em amostras colhidas nas localidades de Mulondo, Toco, Huíla e Rio da Areia. Na localidade da Chibia a espécie mais frequentemente isolada foi *Lb. casei/Lb. paracasei*.

A segunda espécie mais frequentemente isolada foi *Lb. casei/Lb. paracasei* na localidade da Chibia, seguida de *Lb. plantarum*, na localidade de Rio da Areia. Foram também identificadas duas estirpes de *Lb. rhamnosus* em amostras obtidas nas localidades de Mulondo e Humpata, duas de *Lb. helveticus* em amostras obtidas nas localidades da Huíla e Humpata e uma de *Lb. casei* em amostras obtidas na localidade do Toco.

As amostras de *omavele* obtidas na localidade do Toco foram as que apresentaram maior diversidade de bactérias lácticas pertencentes ao género *Lactobacillus*, enquanto as amostras obtidas na localidade de Rio da Areia apresentaram maior diversidade de leveduras.

Nos 141 isolados do *omavele* as espécies mais identificadas foram: 44 *Lb. plantarum* /*Lb. pentosus* (31,20%), 6 *Lb. plantarum* (4,34%), 10 *Lb. casei*/*Lb. paracasei* (7,09%), 2 *Lb. helveticus* (1,41%), 2 *Lb. rhamnosus* (1,41%), 5 *Lc. lactis* (3,54%), 14 *Kazachstania unispora* (9,92%), 12 *Saccharomyces cerevisiae* (8,51%), 12 *Issatchenkia orientalis* (8,5%), 4 *Enterococcus durans* (2,83%), 3 *Enterococcus durans/hirae* (2,12%), 3 *Enterococcus faecalis* (2,12%) e 2 *Kluyveromyces marxianus*/*Kluyveromyces lactis* (1,41%).

A predominância de espécies de *Lb. plantarum*/*Lb. pentosus*, *Lb. plantarum* e de *Lb. casei*/*Lb. paracasei* nas amostras de *omavele* demonstra que desempenham um papel importante na fermentação do mesmo.

Lactobacillus sp. são das mais importantes bactérias pertencentes ao grupo de bactérias lácticas, assumindo um papel de destaque na produção de alimentos fermentados, como vegetais, carnes e particularmente produtos lácteos, por um lado devido à sua ação conservante resultante da acidificação que provocam e por outro devido ao realce do “flavour” e da textura. Atualmente têm vindo a ganhar muita relevância na área dos probióticos (Tannock, 2004).

Matahara *et al.* (2004) ao realizarem um estudo sobre o leite fermentado *kule naoto*, consumido no Quênia pelo grupo étnico dos Massai, observaram que os microrganismos pertencentes ao género *Lactobacillus* eram dominantes, seguidos de *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*. Dentro do grupo *Lactobacillus* foram identificadas as espécies *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. paracasei* e *Lb. acidophilus*, com predominância de *Lb. plantarum*.

De acordo com Matahara *et al.* (2004) o facto do recipiente utilizado (cabaças) para a fermentação do leite ter sido obtido a partir de plantas da família das *Cucurbitaceae* (*Lagenaria leucantha* ou *Lagenaria siceraria*) facilita a adaptação de *Lb. plantarum*, embora nalguns casos haja um tratamento prévio desses recipientes, pois esta espécie de *Lactobacillus* encontra-se frequentemente associada a plantas (Stiles & Holzapfel, 1997). *Lb. plantarum* faz, normalmente, parte das bactérias lácticas não iniciadoras (NSLAB) e é geralmente encontrada em fermentos lácticos artesanais (Curry & Crow, 2002).

A elevada frequência de espécies de *Lb. plantarum* /*Lb. pentosus* no *omavele* é um forte indício de que a microbiota láctica presente no *omavele* era em parte proveniente dos utensílios artesanais (de madeira) utilizados na elaboração do mesmo, da casca ou da raiz de plantas adicionadas opcionalmente ao leite e do recipiente de fermentação (cabaça), o que confirma o já referido por (Mathara *et al.*, 2004).

Lb. plantarum é considerado um microrganismo GRAS, ou seja, é geralmente reconhecido como seguro, por tornar seguros os alimentos fermentados (de Vries *et al.*, 2006) sendo a espécie mais importante no processo fermentativo de vários produtos à base de vegetais e de alguns produtos lácteos. Esta bactéria tem um papel importante como probiótico, na medida

em que é benéfica para a saúde humana. Estirpes de *Lb. plantarum* 299v e Lp 01 encontram-se disponíveis no mercado como probióticos (Mathara *et al.*, 2008).

Matukumira (1996) citado por Mathara *et al.* (2004), em 21 estirpes isoladas a partir de leite naturalmente fermentado produzido no Zimbabwe, identificou três de *Lb. plantarum*, enquanto na África do Sul, Beukes *et al.* (2001) em 336 isolados identificaram o mesmo número de estirpes de *Lb. plantarum*. Isono *et al.* (1994) na Tanzânia, em 26 estirpes isoladas de leites fermentados apenas identificaram 4 como *Lb. plantarum*. No nosso estudo foram identificadas 6 estirpes de *Lb. plantarum* em 141 isolados, muito inferior ao obtido por Matahara *et al.* (2004) em leite fermentado tradicional consumido pela etnia Massai, em que nos 339 isolados 130 foram identificados como *Lb. plantarum* e 6 como *Lb. rhamnosus*, enquanto no *omavele* foram identificadas apenas duas estirpes de *Lb. rhamnosus*.

No leite fermentado *amasi*, produzido na África do Sul e noutros países da África Austral, para além de *Lb. plantarum* foram também identificadas estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, nenhuma destas espécies foi isolada no *omavele* com exceção das espécies *Leuconostoc mesenteroides* e *Lb. plantarum*.

Ferusu e Muzondo (1990) identificaram no leite fermentado tradicional *amasi*, produzido no norte do Zimbabwe, estirpes de *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. casei* subsp. *casei* e *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*, das quais *Lb. helveticus* e *Lb. plantarum* foram também identificadas no *omavele*.

Lb. plantarum foi também identificada no leite fermentado tradicional *maziwa lala* no Quênia, para além de *Lb. curvatus*, e *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, que não foram identificadas no *omavele* (Miyamoto, Gichuru, Akimoto & Nakae, 1989).

Lb. plantarum tem sido isolada a partir dos leites fermentados *kumis* e *kefir* produzidos em alguns países asiáticos (Danova *et al.*, 2005). Por sua vez, Todorov e Franco (2010) referem a presença daquela bactéria em diferentes tipos de queijos, como o Pecorino, o Cheddar, o Stilton, o Gouda, o Kopanisti, o Feta e o Mozzarella, e ainda nos diversos queijos belgas de pasta mole, nos queijos de leite de ovino Alberquila e Manchego, e no queijo fresco branco Marroquino *jben*.

Uchida *et al.* (2007) referem que no leite fermentado tradicional *matsoni*, consumido na Georgia, foram identificados microrganismos termófilos como *Streptococcus thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, enquanto no *omavele* apenas foram identificadas as espécies mesófilas.

Lb. casei /*Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus* possuem elevado valor comercial para a indústria alimentar, devido à sua utilização na produção de leites fermentados e como culturas de arran-

que de fermentação no fabrico de outros produtos lácteos. Estas espécies são frequentemente empregues como probióticos em alimentos industrializados. *Lb. casei* var. *Shirota*, utilizada na produção do *yakult*, é uma das bactérias mais estudadas como probiótico e amplamente consumida no Japão. A utilização de *Lb. casei* em novos tipos de iogurtes tem aumentando progressivamente (Buritti & Saad, 2007).

Em iogurtes de leite de vaca e de búfala consumidos em algumas regiões do Azerbaijão (Karabakh, Ganja e Baku) foram isoladas estirpes de *Lb. delbruekii* subsp. *lactis*, *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* e *Enterococcus faecium*, semelhantes às espécies isoladas no leite fermentado *matsoni* (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2009), mas diferentes das encontradas no *omavele*, com exceção de *Enterococcus faecium*.

Saleh (2013) ao estudar o leite *laban zeer* identificou não só *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus*, *Lb. acidophilus* mas também as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr*, *Candida utilis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Nesse estudo as espécies mais frequentes foram *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (37,5%), *Lb. rhamnosus* (20,8%), *Saccharomyces cerevisiae* (41,9%) e *Candida kefyr* (29%). Nos 141 isolados do *omavele* 44 eram *Lb. plantarum* /*Lb. pentosus* (31,20%), 14 *Kazachstania unispora* (9,92%), 12 *Saccharomyces cerevisiae* (8,51%) e 12 *Issatchenkia orientalis* (8,51%).

Estudos realizados por El-Soda *et al.* (2003) sobre a microbiota do leite fermentado *zabady* revelaram a presença de espécies semelhantes às encontradas no *omavele*, tais como *Lb. paracasei*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecium*. Por sua vez Dewan e Tamang (2007) ao estudarem os leites fermentados tradicionais produzidos nos Himalaias identificaram *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecium*, espécies semelhantes às identificadas no nosso estudo.

Savadoço *et al.* (2004) isolaram várias espécies de bactérias lácticas em leite fermentado tradicional consumido no Burkina-Faso, tais como *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbruekii*, *S. thermophilus*, *Pediococcus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, que não foram identificadas no *omavele*, com exceção de *Pediococcus* spp. e de *Leuconostoc mesenteroides*, embora não se tenha identificado a subespécie. *Lb. plantarum* foi, também, isolada de leites fermentados consumidos nos Camarões (Savadoço *et al.*, 2004) e do leite fermentado desnatado *lben* consumido em Marrocos e outros países Árabes (Ouahghiri *et al.*, 2009).

Estudos realizados por Obodai e Dodd (2006) em leite fermentado *nyarmie* revelaram a presença de *Lb. helveticus*, *Lactococcus lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*, tal como se verificou no *omavele*.

Abd El Gawad *et al.* (2010) ao estudarem o leite tradicionalmente fermentado *rayeb*, consumido no Egito, identificaram as espécies *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. delbuerkii*, *Lactococcus cremoris*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus durans*, *Streptococcus acidominimus* e *Aerococcus viridans*, diferentes das isoladas no *omavele* com exceção de *Enterococcus faecium* e *Lb. helveticus*.

Cueto *et al.* (2007) identificaram no *suero costeno* consumido na costa caribenha da Colômbia várias estirpes de bactérias lácticas, entre as quais *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. rhamnosus* e *Lactococcus lactis*, que também foram identificadas no *omavele*.

No estudo realizado por Matahara *et al.* (2004) em leite fermentado tradicional consumido pelos Massai foram identificadas 35 estirpes de *Lactococcus lactis*, enquanto no *omavele* foram identificadas apenas 5 estirpes em amostras obtidas nas localidades de Chibia (3), Humpata (1) e Rio da Areia (1).

Foram identificadas mais estirpes de *Lactobacillus* do que de *Lactococcus*, supostamente por estes serem mais sensíveis e por isso não terem suportado as condições de stress a que foram submetidas durante o período ocorrido entre o seu isolamento em Angola e a sua identificação no laboratório do CERPTA na Universidade Autónoma de Barcelona.

Lactococcus lactis é uma das principais componentes de muitas culturas de arranque de uso industrial ou artesanal. Essas culturas são utilizadas na produção de uma grande variedade de produtos lácteos fermentados, incluindo leite acidificado, queijos frescos e de pasta mole, porque contribuem para o desenvolvimento da textura devido à produção de exopolissacáridos e do “flavour” quer através da produção de compostos aromáticos (álcoois, cetonas, aldeídos e ésteres) quer da produção de diacetilo, de citratos, de aminoácidos ou do metabolismo das gorduras (Samaržija, Antunac & Havranek, 2001; Beresford *et al.*, 2001; Ward, Davey & Heap, 2002).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* e em menor grau *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* são, com frequência, usadas como culturas de arranque para a fermentação de diversos produtos lácteos (queijos, cremes acidificados, leites fermentados e manteigas). Essas culturas de arranque são constituídas por culturas de estirpes puras ou mistas, associadas ou não a outras bactérias lácticas.

Gonfa, Fite, Urga e Abegaz (1999) referem que estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e de *Lactococcus garvieae* foram predominantes no leite fermentado *ergo* produzido na Etiópia. No nosso estudo não foi identificada nenhuma estirpe de *Lactococcus garvieae*.

Narvhus (2003) referiu que no leite fermentado tradicional *amasi* foi também identificada uma estirpe de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, muito interessante do ponto de vista de produção de leites fermentados tendo em conta que esta bactéria é produtora de exopolissacáridos. No nosso estudo foram também identificadas estirpes de *Lactococcus lactis* em algumas amostras, muito embora não se tenha chegado à identificação da subespécie.

Rashid *et al.* (2007) ao estudarem o leite fermentado tradicional *dahi* no Bangladesh identificaram várias espécies de bactérias lácticas e leveduras, entre as quais *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Enterococcus faecium*, que também foram isoladas no *omavele*. A maior parte das espécies identificadas no *dahi* pertenciam ao género *Lactobacillus*, das quais 28 foram identificadas como *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e 6 como *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Estas espécies de *Lactobacillus* foram também identificadas por Ferusu e Muzondo (1990) e Beukes *et al.* (2001). *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* são constituintes importantes das culturas de arranque utilizadas na produção do iogurte, uma vez que aumentam rapidamente a acidez do leite e deste modo têm uma ação preponderante na sua coagulação.

Watanabe *et al.* (2008) referem que estirpes de *Enterococcus* sp., *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* e *Saccharomyces cerevisiae* foram predominantes em leites fermentados tradicionais consumidos na Região Autónoma da Mongólia Interior pertencente à República Popular da China. Yu *et al.* (2011) identificaram, na Mongólia, algumas espécies bacterianas semelhantes às identificadas no *omavele* tais como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Lb. casei* e *Lb. helveticus*.

Segundo Benkerroum e Tamime (2004) no leite fermentado *lben*, produzido em Marrocos, foram identificadas as espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus avium*, embora a última espécie bacteriana não tenha sido isolada do *omavele*.

No *omavele* apenas foi isolada uma estirpe de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, em amostras colhidas na localidade de Humpata, supostamente pelo facto de não terem sobrevivido à competição microbiana, devido à grande diversidade de microrganismos que o *omavele* possuía. De acordo com Mathara *et al.* (2004), *Leuconostoc* mostra uma fraca competitividade durante a fermentação do leite, daí que a sua presença em leites fermentados seja, por vezes, devida a contaminações após a preparação do leite.

Estudos realizados na Roménia por Zamfir *et al.* (2006) em produtos lácteos fermentados tradicionais revelaram a presença de *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. helveticus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, o que também se verificou no *omavele*.

Akabanda *et al.* (2010) ao estudarem o leite fermentado *nunu* identificaram microrganismos pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, e bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* à semelhança do que ocorreu no nosso estudo com exceção de *Streptococcus*. Espécies bacterianas pertencentes a estes géneros, tais como *Strep. thermophilus*, *Strep. acidominus*, *Enterococcus faecalis* var. *liquefaciens*, *Strep. bovis*, *Strep. mitis*, *Strep. agalactiae*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus xylosum*, *Leu-*

conostoc dextranicum e *Leuconostoc lactis*, foram identificados por Assefa *et al.* (2008) no leite fermentado *ergo*.

As bactérias do género *Weissella* são encontradas ocasionalmente no leite cru, embora não seja conhecido o seu papel em tecnologia de produtos lácteos fermentados (Mathara *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2011). No estudo que estes autores realizaram em leites fermentados consumidos em 13 localidades da Mongólia, apenas isolaram *Weissella cibaria*, diferente da única espécie isolada do *omavele* na localidade da Chibia (*Weissella confusa*/*Weissella* sp.).

Várias espécies de leveduras foram isoladas a partir do *omavele*, em que as mais frequentes foram *Kazachstania unispora* > *Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis* > *Kluyveromyces marxianus*.

Kazachstania unispora foi mais identificada nos isolados de amostras de *omavele* obtidos na localidade do Toco; *Saccharomyces cerevisiae* nos isolados de amostras de *omavele* obtidas nas localidades da Chibia e Mulondo e *Issatchenkia orientalis* nos isolados de amostras obtidas na localidade de Rio da Areia. A maior diversidade de espécies de leveduras foi obtida em amostras provenientes de Rio da Areia, enquanto a de bactérias lácticas foi em amostras oriundas quer da Humpata quer de Rio da Areia. A diversidade de leveduras nos produtos fermentados varia de acordo com a localidade, podendo ser influenciada pela idade das amostras, pelos próprios recipientes e pelos métodos de processamento (Savado *et al.*, 2006.)

As leveduras estão frequentemente associadas aos produtos lácteos fermentados, o que tem sido reportado em vários estudos (Fleet, 1990; Okagbue & Bankole, 1992; Isono *et al.*, 1994; Roostita & Fleet, 1996; Gadaga *et al.*, 2001; Beukes *et al.*, 2001; Gonfa *et al.*, 2001; Abdelgadir *et al.*, 2001). A contaminação dos leites por estes microrganismos ocorre, supostamente, a partir do ambiente, dos utensílios, dos produtores e dos recipientes.

Kluyveromyces marxianus está entre as leveduras predominantes e importantes presentes no leite cru. A capacidade desta levedura para fermentar a lactose e hidrolizar a gordura do leite e as proteínas, possibilita o seu crescimento nos produtos lácteos (Roostita & Fleet, 1996; Gadaga *et al.*, 2000). No entanto, no *omavele* esta levedura foi a terceira mais identificada contrariando de certa forma o que foi anteriormente referido. As leveduras são utilizadas como culturas de arranque porque interferem, geralmente, na qualidade dos leites fermentados realçando-lhes o “flavour” e a textura, devido à ação de substâncias resultantes da sua atividade proteolítica e lipolítica, da utilização do ácido láctico, da fermentação da lactose e da autólise da sua biomassa (Jakobsen & Narvhus, 1996; Fleet, 2007).

Segundo Saleh (2013), *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida kefir* são importantes no desenvolvimento do “flavour” característico do *laban zeer* produzido na Arábia Saudita, devido à produção de ácido láctico que decorre da co-cultura com BAL.

Algumas leveduras foram desenvolvidas como agentes de biocontrole de bolores deteriorantes de alimentos por apresentarem atividade antagônica relativamente aos bolores, para além disso tem havido um crescente interesse em usar as leveduras como organismos probióticos, apesar de fazerem parte integrante da microbiota de muitos produtos lácteos fermentados. Por outro lado, existem leveduras que, em alimentos fermentados, metabolizam os ácidos orgânicos causando um aumento do pH, o que vai permitir o crescimento de bactérias patogênicas e de deterioração (Fleet, 2007; El-Sharoud *et al.*, 2009).

Os produtos fermentados contendo leveduras naturais diferem consideravelmente quanto à composição físico-química e às propriedades microbiológicas daqueles preparados com culturas puras de bactérias lácticas, uma vez que nos primeiros para além de ocorrer a fermentação láctica induzida pelas bactérias lácticas ocorre também uma ligeira fermentação alcoólica.

Os mais conhecidos leites fermentados resultantes de uma combinação de leveduras e de bactérias lácticas são o *kefir* e o *kumis*, ambos originários dos países da Europa oriental e Ásia. *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolitica* e *Rhodotorula mucilaginosa* têm sido as espécies mais isoladas a partir de produtos lácteos (Gonfa *et al.*, 2001; Narvhus & Gadaga, 2003; Kebede *et al.*, 2007). No entanto, estudos realizados em leites fermentados em África (Gadaga *et al.*, 2000; Abdelgadir *et al.*, 2001; Narvhus e Gadaga, 2003;) referem a presença de várias espécies de leveduras, entre as quais *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefir* e *Torulaspora delbrueckii*, que também foram identificadas no *omavele*.

Akabanda *et al.* (2010) identificaram no leite fermentado *nunu* algumas leveduras semelhantes às encontradas no *omavele*, embora em quantidades mais elevadas como *Saccharomyces cerevisiae* (35%), *Candida kefir* (33%) e *Kluyveromyces marxianus* (4%). De acordo com Tamang e Fleet (2007) essas leveduras fazem parte da microbiota normal do *kefir*.

Em amostras de *omavele* também foi isolada uma estirpe de *Rhodotorula mucilaginosa* em amostras colhidas na localidade da Chibia.

Gadaga *et al.* (2000 e 2001a) ao estudarem a microbiota láctica do leite fermentado *amasi* ou *mukaka wa kakara* produzido no Zimbabwe isolaram várias leveduras, em que a mais frequente foi *Saccharomyces cerevisiae*, que também foi isolada no *omavele*.

Saccharomyces cerevisiae e *Kluyveromyces marxianus* foram as espécies de leveduras mais isoladas a partir dos leites fermentados tradicionais *makamo* consumidos no Uganda, *nono* consumido na Nigéria, *nunu* no Gana (Okagbue & Bankole, 1992) e *mbanik* consumido no Senegal (Akabanda *et al.*, 2010), enquanto no leite fermentado tradicional *omavele* as leveduras mais frequentes foram *Kazachstania unispora* seguida de *Issatchenkia orientalis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Em leites fermentados produzidos na África do Sul (Narvhus & Gadaga, 2003) *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspota delbrueckii* e *Kluyveromyces marxianus* foram as espécies predominantes, enquanto no *omavele* as espécies predominantes foram *Kazachstania unispora*, *Issatchenkia orientalis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

De acordo com Gadaga *et al.* (2000) *Saccharomyces cerevisiae*, além de ubíqua, tem capacidade de se desenvolver no leite e por isso contribuir para realçar o “flavour” dos leites fermentados através da conversão de hidratos de carbono em álcoois e outros compostos aromáticos, como ésteres de ácidos orgânicos e compostos carbonados. *Saccharomyces cerevisiae* tem sido predominante em vários produtos lácteos fermentados tais como: *rob*, *nono*, *mbanike* e outros. A nível da indústria de bebidas *Saccharomyces cerevisiae* tem um grande impacto naquilo que são os aromas dos produtos fermentados (Gadaga *et al.*, 2000; Abdelgadir *et al.*, 2001; Jespersen, 2003). Segundo Jespersen (2003) *Saccharomyces cerevisiae* estimula o crescimento de outros microrganismos, incluindo bactérias lácticas, porque fornece metabolitos essenciais como piruvato, aminoácidos e vitaminas.

Benkerroum e Tamime (2004) identificaram no *lben*, leite fermentado produzido em Marrocos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, que também foram identificadas no *omavele*. *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura que além de fermentar a lactose tem atividade lipolítica e proteolítica, enquanto *Saccharomyces cerevisiae* é a única capaz de utilizar a glucose e a galactose (Kebede *et al.*, 2007).

Watanabe *et al.* (2008), para além de *Saccharomyces cerevisiae*, ainda identificaram no leite fermentado *tarag* as espécies *Issatchenkia orientalis* e *Kazachstania unispora* também identificadas no nosso estudo. Segundo aqueles autores, *Saccharomyces unispora* (sinónimo senior de *Kazachstania unispora*) foi predominante no *kumis* tradicional produzido no Cazaquistão, à semelhança do que ocorreu no *omavele*.

No presente estudo foram identificadas três espécies de *Enterococcus*, em que *Enterococcus durans*/*Enterococcus* sp. foi frequente nas amostras de *omavele* obtidas nas localidades da Huíla e da Humpata; *Enterococcus faecalis* nas amostras obtidas nas localidades do Toco e da Chibia; *Enterococcus durans*/*Enterococcus hiraе* nas amostras obtidas na localidade de Mulondo.

A presença de bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* em produtos lácteos foi sempre considerada como indicador de deficientes condições higio-sanitárias durante a produção e o processamento do leite. Contudo, tem sido demonstrado que a presença de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em muitos produtos alimentares não tem relação direta com a contaminação fecal, sendo consideradas como parte normal da microbiota natural de muitos produtos lácteos, particularmente de alguns queijos mediterrânicos, onde predominam *Lacto-*

bacillus e *Lactococcus* (Terzic-Vidojovic *et al.*, 2009), desempenhando um papel relevante no desenvolvimento do aroma e do sabor dos queijos (Giraffa, 2003).

Enterococcus durans e *Enterococcus faecalis* foram as espécies mais frequentes no *omavele*. Segundo Zamfir *et al.* (2006) a sua presença está, geralmente, relacionada com a utilização de leites não pasteurizados.

Segundo Cogan *et al.* (1997) *Enterococcus* é um dos microrganismos que mais resiste a condições adversas, tais como a presença de sal e a acidez, o que explica a sua predominância em queijos. Apesar de alguma controvérsia, estas bactérias têm contribuído para a maturação e desenvolvimento das características organolépticas não só de alguns queijos, como o Cheddar, o Feta, o Mozzarella, o Cebreiro e o Venaco, devido à sua intensa atividade proteolítica e esteolítica (hidrólise de gorduras por esterasas), mas também de outros alimentos fermentados tais como azeitonas, vegetais e linguiças. A sua capacidade de produzir enterocinas justifica a sua utilização em tecnologia de alimentos.

Algumas estirpes, principalmente de *Enterococcus faecium* e de *Enterococcus faecalis*, podem produzir bacteriocinas que atuam sobre alguns microrganismos patogénicos, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Vibrio cholerae* (Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

Devido à ação daqueles microrganismos durante a maturação, como o desenvolvimento do “flavour” e a produção de bacteriocinas, tem sido sugerido que estirpes de *Enterococcus* com características metabólicas e tecnológicas desejáveis sejam incluídas em culturas de arranque utilizadas na produção de vários queijos (Franz *et al.*, 2003).

De acordo com Foulquié Moreno *et al.* (2006) os enterococos, além de poderem exibir atividade probiótica, desempenham um papel importante no desenvolvimento do perfil sensorial de produtos lácteos devido à sua atividade metabólica sobre o citrato e proteínas.

Apesar de *Enterococcus faecium* se encontrar no trato gastrointestinal dos animais tem sido frequentemente isolado a partir de vários produtos lácteos e cárneos autóctones (Klein, 2003). Rashid *et al.* (2007) referem a presença de *Enterococcus faecium* no *dahi*, leite fermentado tradicional produzido na Bangladesh. Aquele microrganismo tem também sido isolado noutros leites fermentados produzidos no centro da Mongólia e na China. Por isso é discutível considerar a sua presença como indicador de higiene deficiente (Suzzi *et al.*, 2000). A sua presença em produtos lácteos tradicionais é provavelmente devida à contaminação do leite durante a ordenha. Contudo, como já foi referido, esta espécie é também utilizada em culturas de arranque para a preservação de alimentos fermentados, incluindo queijos e vegetais.

De acordo com Savadogo *et al.*, (2006) os produtos resultantes de um processo fermentativo são considerados higienicamente seguros, estáveis e com propriedades sensoriais atrativas.

Lavermicocca *et al.* (2000) e Messens e De Vuyst (2002) referem que compostos como peróxido de hidrogénio, diacetilo, acetaldeído, ácidos gordos (antifúngicos), ácido fenólico e/ou bacteriocinas, produzidos durante a fermentação protegem os alimentos da ação dos microrganismos responsáveis pela decomposição e dos microrganismos patogénicos.

A microbiota láctica presente nas amostras de *omavele* obtidas nas diferentes localidades é diversificada. De acordo com Al-Otaibi (2012), a microbiota láctica presente em produtos lácteos é influenciada pela região geográfica e a sua distribuição depende da natureza dos alimentos fermentados no geral e do leite fermentado em particular.

Lb. plantarum foi identificada nas seis localidades em estudo independentemente das diferenças climáticas, enquanto *Lb. casei/Lb. paracasei* e *Lactococcus lactis* foram identificadas com maior frequência na localidade da Chibia. Nesta localidade coexistiram as espécies *Lb. casei/Lb. paracasei*, *Lactococcus lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* e de acordo com as observações no local, pudemos constatar que o *omavele* possuía características organolépticas (textura e aroma) diferentes das do *omavele* de outras localidades. A maior diversidade de espécies de leveduras (8) foi obtida na localidade de Rio da Areia devido às características geográficas específicas da região.

As diferenças obtidas podem ser devidas às condições climáticas, à higiene de produção (ordenha, utensílios, recipiente e local), ao estado de saúde dos animais e à qualidade da água no meio rural (Benkerroum, 2013). As cascas ou raízes de várias plantas, que podem ou não ser adicionadas ao leite com o objetivo de acelerar a coagulação e de conferir odores e sabores diferentes, podem funcionar como fonte de microrganismos e assim contribuir para as diferenças microbianas encontradas. A região geográfica pode ter sido a principal razão da biodiversidade verificada nas amostras recolhidas nas diferentes localidades, que foram alvo do nosso estudo.

Savadoغو *et al.* (2004) referem que os leites fermentados tradicionais produzidos em regiões onde predominam baixas temperaturas ambientais contêm na sua maioria BAL mesófilas, tais como *Lactococcus* sp. e *Leuconostoc* sp., enquanto nos produzidos em climas tropicais e subtropicais prevalecem as BAL termófilas, sendo na sua maioria *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus* sp.. No nosso estudo, realizado em regiões de planalto onde a temperatura ambiental ronda os 17-25 °C, não só foram identificadas estirpes de *Lactococcus* mas também várias estirpes mesófilas de *Lactobacillus*.

Zamfir *et al.* (2006) e Dewan e Tamang (2007) referem que os produtos lácteos fermentados tradicionais têm uma microbiota única e diferente, em função da tecnologia de produção, da ecologia e da tradição das localidades onde são produzidos. Para Savadoغو *et al.* (2006) a natureza dos leites fermentados tradicionais varia de região para região, em função da microbiota autóctone local, a qual por sua vez reflete as condições climáticas da região.

4.4. Produção de leites fermentados tradicionais

A produção do *omavele* além de ser simples é semelhante à produção dos diferentes leites fermentados tradicionais, como o *nono* da Nigéria (Wouters *et al.*, 2002), o *amasi*, o *inkomasi* e o *mukaka wakokora* da África do Sul e do Zimbábue, consumidos pelos povos Bantu da África Austral (Ferusu & Muzondo, 1990), o *lben* de Marrocos (Ouahghiri *et al.*, 2009), o *rob* do Sudão (Abdelgadir *et al.*, 2001), como os leites fermentados tradicionais da Roménia (Zamfir *et al.*, 2006), o *leben* da Tunísia, o *laban* do Líbano e de outros países Árabes. Os leites referidos são produzidos de forma artesanal por fermentação espontânea de leite de vaca, ou através da técnica do “back-sloping” que consiste em adicionar a cada nova produção de leite fermentado uma porção do leite fermentado da produção anterior.

A tecnologia de produção do *omavele* é diferente da do *ergo* e do *ititu* da Etiópia, da do *maziwa lala* do Quênia e da do *maziwa mgando* da Tanzânia, uma vez que durante a elaboração dos mesmos se vai adicionando ao leite fermentado já existente o leite resultante da ordenha diária, num recipiente previamente defumado. Este processo pode levar cerca de 2 a 4 dias até se atingir a acidez desejada. No caso concreto do *ititu* o período de fermentação é de cerca 14 dias. Estes produtos geralmente apresentam um cheiro e sabor a fumo.

O recipiente utilizado para a elaboração do *omavele* não era defumado, era apenas lavado com água e esporadicamente.

O leite fermentado *zabady*, produzido no Egito e muito conhecido no Médio Oriente, é caracterizado por ter um sabor a cozinhado e uma consistência firme como o iogurte. A produção do *zabady* é diferente da do *omavele*, na medida em que no primeiro caso o leite de búfala ou de vaca é fervido e depois de arrefecido é inoculado com uma porção da produção anterior de *zabady* (El-Baradei *et al.*, 2008), enquanto o *omavele* estudado foi feito com leite de vaca cru. Por outro lado, a produção do *nyarmie* no Ghana (Obodai & Dodd, 2006), também difere da do *omavele*, uma vez que o primeiro é feito com leite pasteurizado, que depois é arrefecido para se poder remover a gordura acumulada à superfície e posteriormente é posto a incubar à temperatura de 28-30°C, durante a noite.

Na Geórgia, o leite fermentado tradicional *matsoni* é produzido de forma artesanal com leite de vaca, ao qual se adiciona uma cultura de arranque constituída por bactérias termófilas. O processamento é semelhante ao do *omavele*, a diferença está no tipo de microrganismos que compõem a cultura de arranque utilizada (Uchida *et al.*, 2007). O *matsoni* consome-se como bebida de acompanhamento das refeições, principalmente o almoço. Muitas vezes é adicionado ao arroz. É frequentemente consumido em datas festivas.

A produção do leite fermentado pode variar de local para local, mas o fator mais influente na qualidade do produto fermentado é o recipiente (Kebede *et al.*, 2007). Há referências sobre a

influência do recipiente na qualidade do leite fermentado, de que é exemplo o *amasi* produzido em recipiente de pedra, que é diferente do produzido numa cabaça. O povo Sotho da África do Sul utiliza recipientes de barro e acredita que o produto resultante tem um sabor e um cheiro mais agradáveis (FAO, 1990).

Os recipientes são, geralmente, simples e feitos com materiais locais disponíveis como fibras vegetais, pele de animais, cabaças e madeiras ocas (FAO, 1990). As cabaças, panelas de barro e de madeira, são muito utilizadas em várias regiões da Etiópia, Quênia, Sudão e Egito (Abdelgadir *et al.*, 2001; Bonfoh, *et al.*, 2003). Os leites fermentados em recipientes de barro e cabaças apresentam, geralmente, um número elevado tanto de bolores e leveduras como de bactérias lácticas, o que pode ser devido à frequente dificuldade na higienização destes recipientes (Kebede *et al.*, 2007).

4.5. Composição microbiana dos fermentos

Para a produção dos três leites fermentados – O1, O2 e O3 – foram utilizados os fermentos FO1 (tabela 7), FO2 (tabela 8) e FO3 (tabela 9) constituídos por estirpes de BAL homo e heterofermentativas e por leveduras, entre as quais *Saccharomyces cerevisiae*, muito usada na indústria alimentar. O ácido láctico é o principal produto final do metabolismo das BAL homofermentativas (*Lb. casei*, *Lb. helveticus* e *Lactococcus lactis*). Algumas estirpes de *Lb. plantarum* são homofermentativas e outras são heterofermentativas facultativas, produzindo estas, durante a fermentação, não só ácido láctico mas também diacetilo, acetoína e 2,3-butanediol a partir do piruvato (Corsetti & Gobetti, 2002).

As estirpes de BAL utilizadas para a produção industrial do *omavele* têm sido identificadas em vários produtos lácteos fermentados em diversas regiões a nível mundial e encontram-se tanto nos fermentos naturais como na microbiota da grande maioria dos queijos durante a fase de maturação.

Lb. helveticus tem sido utilizado em associação com outras bactérias termófilas (*S. thermophilus*) e com alguns lactobacilos (*Lb. delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*) para a produção do iogurte comercial e de alguns queijos como o Gruyère em França, o Emmental na Suíça e o Grana em Itália (Beresford *et al.*, 2001). *Lb. plantarum* e *Lb. casei*/*Lb. paracasei*, apesar de não fazerem parte dos fermentos comerciais atuais, encontram-se com frequência em vários leites fermentados de produção artesanal.

Durante a fermentação de produtos lácteos, *Lactococcus* spp. é responsável pela acidificação devido à produção de ácido láctico L(+), pelo desenvolvimento de uma boa textura devido à produção de exopolissacáridos e pelo “flavour” devido à produção de compostos aromáticos (álcoois, cetonas e aldeídos) a partir do citrato, dos aminoácidos ou do metabolismo das gorduras (Cool-

bear, Crow, Holland, Liu & Reid 2002). *Lactococcus lactis* faz parte dos fermentos industriais utilizados na produção de muitos produtos lácteos, devido à sua capacidade de produzir ácido láctico e de converter a proteína do leite em compostos aromáticos responsáveis pelo “flavour”.

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *K. marxianus* fazem parte da composição do fermento utilizado para a produção do *kumis* e do *kefir* e estão presentes em vários leites fermentados, quer artesanais quer industriais (Jespersen, 2003). Duma maneira geral as leveduras contribuem positivamente para o processo de maturação de muitos tipos de queijos, estando na origem de mudanças que são desejáveis nos produtos lácteos fermentados (Westall & Filtenborg, 1998)

4.6. Avaliação sensorial das três produções de *omavele*

Os resultados da avaliação sensorial feita a cada um dos leites fermentados – O1, O2 e O3 – produzidos na oficina tecnológica do CERPTA constam da tabela 15.

O resultado da avaliação sensorial do *omavele* 1 (O1), com pH 4,94, permite-nos verificar que apresentou uma pontuação elevada para os atributos cheiro lácteo (4,5), outros sabores (5) e textura fina (5,7) conforme se pode verificar na tabela 15. Apesar de pouco acentuado, notou-se um sabor levemente ácido.

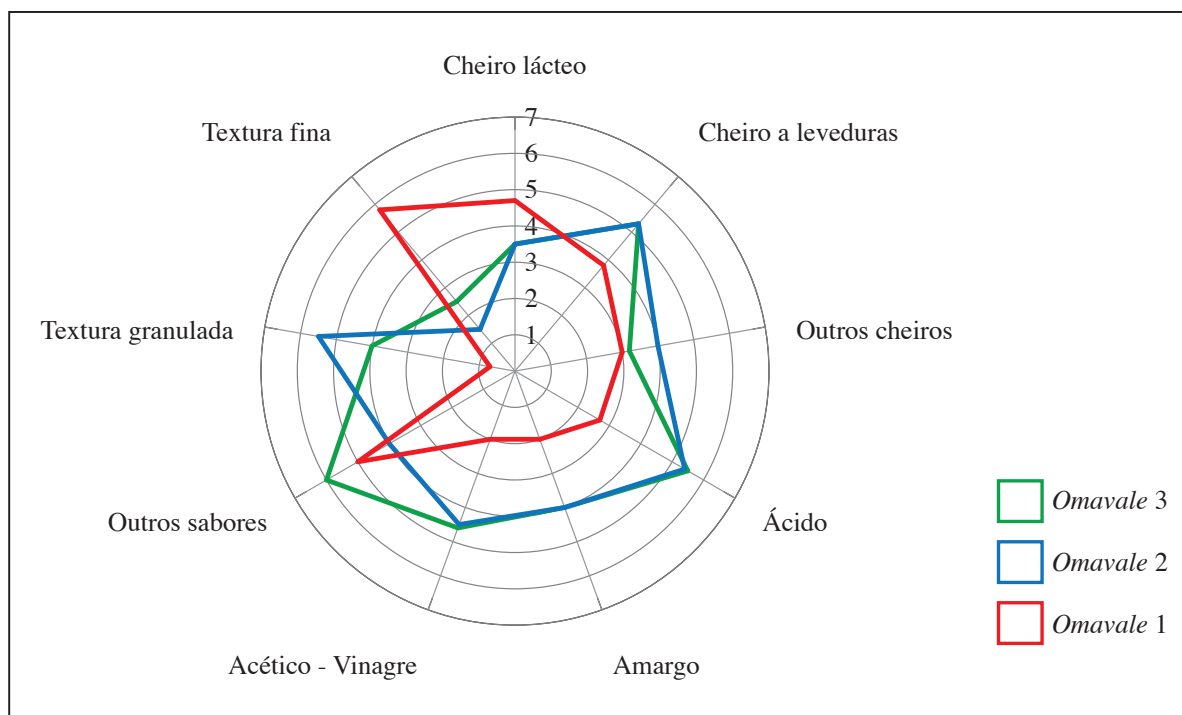
O facto de ter apresentado uma pontuação 5 para outros sabores está provavelmente relacionada com os compostos resultantes do metabolismo das bactérias lácticas presentes no fermento que, com exceção de *Lactococcus lactis*, não são frequentes em fermentos comerciais mas fazem parte da microbiota de leites de produção artesanal e da microbiota secundária de muitos queijos em fase de maturação. Segundo Johnson e Steele (1997) o aroma e o sabor dos leites fermentados e de outros produtos lácteos dependem diretamente da atividade metabólica da cultura de arranque e da microbiota secundária que pode ser deliberadamente adicionada para produzir aromas. *Lactobacillus plantarum*, considerada como integrante da microbiota secundária em queijos, tem também algum efeito sobre a textura e o “flavour”, como resultado da sua atividade metabólica e da produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas. O composto principal responsável pelo aroma é o diacetilo, que resulta do metabolismo do citrato presente no leite por ação de algumas BAL, entre as quais *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* e lactobacilos heterofermentativos (Stanley, 1998; Lindgren & Dobrogosz, 1990 citado por Caplice & Fitzgerald, 1999). O *omavele* 1 (O1) apresentou pontuação 4,5 para cheiro à lacteo, semelhante ao de um iogurte natural devido supostamente a presença de estirpes de lactobacilos heterofermentativos (*Lb. plantarum* /*Lb. pentosus*) e de lactobacilos heterofermentativos facultativos (*Lb. casei*) e de *Lactococcus lactis*.

Apesar da presença de estirpes de bactérias lácticas homofermentativas (*Lc. lactis*), a quantidade de ácido láctico produzido pelas bactérias não foi suficiente para reduzir o pH a níveis mais baixos, de forma a levar à precipitação da caseína, e conseqüentemente à coagulação do leite, daí apresentar uma textura mais fina.

Tabela 15. pH e resultado da avaliação sensorial dos três *omaveles* (O1, O2 e O3) produzidos na oficina tecnológica do CERPTA.

		<i>Omavele 1</i>	<i>Omavele 2</i>	<i>Omavele 3</i>
Cheiro	Lácteo	4,5	3,4	3,4
	Leveduras	3,7	5,3	5,3
	Outros	3,2	3,8	3,2
Sabor	Ácido	2,6	5,4	5,6
	Amargo	2,0	3,9	3,9
	Acético/vinagre	1,9	4,5	4,4
	Outros	5,0	4,0	6,0
Textura	Granulada	1,6	5,4	4,1
	Fina	5,7	2,3	3,3
pH		4,94	4,32	4,24

Figura 18. Perfil sensorial dos leites fermentados O1, O2 e O3 produzidos com os fermentos FO1, FO2 e FO3.



O *omavele* 2 (O2), com pH 4,32, apresentou maior pontuação para os atributos cheiro a levedura (5,3), sabor ácido (5,4) e textura granulada (5,4) conforme se pode verificar na tabela 15. O pH deste leite era mais baixo que o do O1, por isso o sabor ácido devido a uma maior produção de ácido láctico por parte das bactérias presentes no fermento e textura mais granulada devido à precipitação da caseína que ocorre a um pH de 4,6 que corresponde ao ponto isoelétrico da mesma. Segundo Stanley (1998) a textura dos leites fermentados depende essencialmente do ácido láctico produzido pelas BAL, porque durante o processo de fabrico destes produtos não há adição de enzimas coagulantes e a coagulação resulta da descida progressiva do pH até ao ponto isoelétrico da caseína, momento em que se desestabiliza e precipita. *Lactococcus lactis* é uma das bactérias utilizadas com a finalidade de melhorar a consistência e/ou a viscosidade dos produtos lácteos uma vez que é produtora de EPS .

O *omavele* 3 (O3) apresentou maior pontuação para o atributo cheiro a levedura (5,3), outros sabores (6) e textura granulada (4,1) conforme se pode ver na tabela 15. Dos três *omaveles* foi o que apresentou o pH mais baixo o que justifica a pontuação de 5,6 para o atributo sabor ácido, por outro lado apresentou pontuação 6 para outros sabores tendo sido por isso o que menos agradou aos provadores de acordo com a apreciação dos mesmos (Anexo 3). Esta pontuação está relacionada com a atividade metabólica dos microrganismos presentes no fermento (FO3), sendo na sua maioria leveduras. Cinco dos provadores preferiram o *omavele* O1, 4 o *omavele* O2 e apenas 2 preferiram o *omavele* O3.

Os *omaveles* O2 e O3 apresentaram pontuações mais elevadas para o cheiro a levedura do que o *omavele* O1 porque naqueles a concentração de leveduras foi maior do que no O1 (tabela 11). Algumas leveduras produzem proteases, lipases, amilases e pectinases extracelulares que têm impacto no “flavour” e na textura dos produtos (Fleet, 2007).

As leveduras não fermentadoras de lactose são determinantes na formação de sabores e cheiros típicos a leveduras. Segundo Forss (1969) citado por Stanley (1998), a atividade proteolítica e lipolítica das leveduras está na origem de numerosos compostos voláteis, péptidos e aminoácidos que têm influência no “flavour” dos leites fermentados.

O aroma fundamental dos leites fermentados é devido à presença de compostos voláteis como o ácido acético, o acetaldeído e o diacetilo, produzidos por algumas bactérias lácticas.

4.7. Avaliação microbiológica dos leites fermentados O1, O2 e O3.

Conforme se pode verificar na tabela 16 as contagens de *Lactobacillus* no leite O1 mantiveram-se constantes até ao 30º dia tanto na 1ª produção (1ª P) como na 2ª produção (2ª P), em que os valores obtidos foram de $9 \log_{10}$ ufc/mL e $8 \log_{10}$ ufc/mL, respetivamente. No leite O2

houve uma redução ao 15º dia tanto na 1ª P como na 2ª P. No leite O3 quer na 1ª P quer na 2ª P houve uma redução ao 15º dia e ao 30º dia.

Tabela 16. Teores de microrganismos viáveis nos leites fermentados O1, O2 e O3 (\log_{10} ufc/mL).

Produto	Microrganismos	1º D		15º D		30º D	
		1ªP	2ªP	1ª P	2ªP	1ªP	2ªP
O1	<i>Lactobacillus</i>	9,15	8,04	9,08	8,61	9,06	8,51
	<i>Lactococcus</i>	8,98	8,67	9,11	8,49	8,93	8,31
	Leveduras	7,59	6,79	7,18	6,93	7,10	6,72
O2	<i>Lactobacillus</i>	9,15	9,05	8,36	8,44	8,10	8,48
	<i>Lactococcus</i>	9	9,14	8,47	8,34	8,19	8,29
	Leveduras	7,28	7,26	7,20	7,23	7,17	6,91
O3	<i>Lactobacillus</i>	9,18	9,06	8,83	8,15	7,02	6,94
	<i>Lactococcus</i>	9,13	8,74	9,05	8,23	7,14	6,74
	Leveduras	7,51	7,19	7,40	7,17	7,40	7,02

Quanto à contagem de *Lactococcus* spp. no leite O1, na 1ª P observou-se um aumento ao 15º dia e depois uma redução ao 30º dia, enquanto que na 2ª P as contagens mantiveram-se constantes ($8 \log_{10}$ ufc/mL) até ao 30º dia. Nas duas produções do leite O2 verificou-se uma redução ao 15º dia. No leite O3 houve redução de 1 ciclo logarítmico entre o 1º e 30º dia na 1ª P e de dois ciclos logarítmicos entre o 1º e 30º dia na 2ª P (tabela 16).

As contagens de *Lactobacillus* e de *Lactococcus* no leite O3 ao 30º dia, apesar de relativamente baixas ($6 \log_{10}$ ufc/mL), encontravam-se dentro do limite mínimo aceitável de BAL viáveis em leites fermentados (tabela 16).

Relativamente às leveduras, no leite fermentado O1 as contagens mantiveram-se constantes até ao 30º dia nas duas produções, $7 \log_{10}$ ufc/mL na 1ª P e $6 \log_{10}$ ufc/mL na 2ª P. No leite O2 as contagens da 1ª P mantiveram-se constantes até ao 30º dia e na 2ª P só ao 30º dia se observou uma redução. No leite fermentado O3 as contagens de leveduras mantiveram-se constantes ($7 \log_{10}$ ufc/mL) nas duas produções até ao 30º dia (tabela 16). As diferenças encontradas entre os teores de microrganismos nos três leites fermentados durante as duas produções, apesar de não se ter feito uma análise estatística, não foram relevantes, tendo sido verificada uma estabilidade dos mesmos ao longo dos 30 dias.

As contagens de BAL e de leveduras nos leites fermentados O1, O2 e O3 mantidos à temperatura de refrigeração durante 30 dias foram compatíveis com a norma do *Códex Alimentarius*,

que preconiza para leites fermentados contagens de BAL totais de 10^7 ufc/g como mínimo e de leveduras de 10^4 ufc/g como mínimo, no produto final (Códex STAN 243-2003).

Para que os leites fermentados tenham efeito terapêutico e potencial probiótico o número viável de células probióticas deve ser superior a 10^6 ufc/mL até ao momento do consumo (Lourens- Hattingh & Viljoen, 2002).

De acordo com Tamime (2002) o fermento deve ser viável, ativo e abundante, com cerca de 10^7 ufc/g no produto final e assim se deve manter até ao seu consumo.

Lourens-Hattingh e Viljoen (2002) verificaram que as concentrações de *Debaryomyces hansenii* ($\pm 7,4 \log_{10}$ ufc/mL) e de *Issatchenkia orientalis* ($\pm 7,3 \log_{10}$ ufc/mL) inoculadas em leite UHT se mantinham constantes durante 32 dias, período suficiente para evitar a diminuição excessiva do pH. Nos leites O1, O2 e O3 as concentrações de leveduras ($7 \log_{10}$ ufc/mL) mantiveram-se constantes durante trinta dias.

Os elevados teores de bactérias lácticas e de leveduras em amostras de *omavele* – O1, O2 e O3 – produzido de modo semi-industrial na oficina tecnológica do CERPTA (tabela 16) foram devidos: a) ao tratamento térmico a que o leite foi sujeito antes da produção do *omavele* industrial, tendo provocado alterações nos componentes do leite de modo a favorecer o crescimento das BAL; b) à estabilidade da temperatura de incubação; c) à elevada concentração do inóculo.

As bactérias lácticas e as leveduras presentes no *omavele* (tabela 16) produzido na oficina tecnológica do CERPTA suportaram bem a temperatura de incubação a que foram sujeitas, o que constitui um bom indicador para a sua utilização na indústria de lacticínios.

5. Conclusões

A microbiota do *omavele* é diversificada, tendo-se registado uma predominância de bactérias lácticas e de leveduras sobre outros microrganismos, o que faz com que o produto tenha características organolépticas específicas.

As BAL e leveduras isoladas a partir de amostras de *omavele* recolhido nas diferentes localidades e identificadas através de técnicas de biologia molecular revelaram alguma semelhança, tendo-se verificado predominância da espécie *Lb. plantarum/L.pentosus* e de *Kazachstania unispora*.

As concentrações de leveduras no *omavele* de produção artesanal foram elevadas, este facto pode sugerir que sejam parte integrante da microbiota comum dos utensílios e recipientes utilizados.

A qualidade higio-sanitária do *omavele* foi razoável, considerando que os teores de bactérias indicadoras dessa qualidade não foram elevados.

O *omavele* O1 foi o preferido pelo painel de provadores.

O *omavele* poderá ser considerado um produto probiótico, devido à concentração das BAL e às características das estirpes seleccionadas, depois de realizados os estudos clínicos correspondentes.

6. Perspetivas

Estudar as características tecnológicas, propriedades probióticas e antimicrobianas das BAL identificadas.

Aprofundar o estudo sobre as características sensoriais do produto.

Avaliar o efeito das plantas ou raízes adicionadas ao *omavele* sobre as características organolépticas do produto.

Bibliografia

- Abdalla, M. O. M. & Ahmed, S. Z. A. N. (2010). Evaluation of microbiological quality of Sudanese Fermented dairy product “mish” during storage. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2 (3), 155-158.
- Abdalla, W. M. & El-Zubier, I. E. M.(2006). Microbial hazards associated with fermented milk (roub and mish) processing in Suddan. *International Journal of Dairy Sciences*, 1 (1), 21-26.
- Abd El-Salam, A. M., Al-Dekheil, A., Babkr, A., Farahna M. & Mousa, H. M. (2010). High fiber probiotic fermented mare’s milk reduces the toxic effects of mercury in rats. *North American Journal Medicine Science*, 2, 569-575.
- Abd El-Salam, M. H. (2002). Fermented milks/Middle East. In H. Roginski, J. Fuquay & P. F. Fox (Eds). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. (2nd ed.). (pp. 1041-1044). London: Academic Press.
- Abdelbasset, M. & Djamila, K. (2008). Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk “Raib”. *African Journal of Biotechnology*, 7 (16), 2908-2914.
- Abdelgadir, W. S., Ahmed, T. K. & Dirar, H. A. (1998).The traditional fermented milk products of the Sudan. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 1-13.
- Abdelgadir, W. S., Hamad, S. H., Moller, P. L. & Jakobsen, M. (2001). Characterization of the dominant microbiota of Sudanese fermented milk *Rob*. *International Dairy Journal*, 11, 63- 70.
- Abd El Gawad, I. A., Abd El Fatah & Al Rubayyi, K. A. (2010). Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional *rayeb* milk in Egypt. *Journal of American Science*, 6, (10) 728-735.
- Abee, T., Krockel, L. & Hill, C (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol*, 28,169-185.
- Abeer, A. A., Abdel, All & Dardir, H. A. (2009). Hygienic quality of local traditional fermented skimmed milk. *World Journal Dairy & Food Science*, 4, 205-209.
- Adams, M. R. & Nicolaides, L. (1997). Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8, 227-239.
- Adesokan, I. A., Odetoyinbo, B. B., Ekanola, Y. A., Avanrenren, R. E. & Fakarede, S. (2011). Production of Nigerian *nono* using lactic acid starter cultures. *Pakistan Journal of Nutrition* 10, 203-207.
- Adnan, A. F. M. & Tan, I. K. P. (2007). Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 98, 1380-1385.

- Agerholm-Larsen, L., Raben, A., Haulrik, N., Hansen, A. S., Manders, M. & Astrup, A. (2000). Effects of 8 weeks intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, 288–297
- Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J., Glover, R. L. K. & Tano-Debrah, K. (2010). Microbiological Characteristics of Ghanaian traditional fermented milk product, *nunu*. *Nature and Science*, 8 (9), 178-187.
- Al-Otaibi, M. M. (2012). Isolation and identification of lactic bacteria and yeasts from Sameel milk: A Saudi traditional fermented milk. *International Journal of Dairy Science*, 7, 73-83.
- Amenu, D. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from “Ergo”, Ethiopian traditional fermented milk. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 1, 278-284.
- Antoine, J. M. (2011). Les ferments lactiques et les laits fermentés : nature et effets. *Phytoterapie*, 9, 76-81.
- Anukamk, C. & Reid, G. (2009). African traditional fermented foods and probiotics. *Journal of Medicinal Food*, 12 (6), 1177-1184.
- Ashenafi, M. (1996). Effect of container smoking and incubation temperature on the microbial and some biochemical qualities of fermenting Ergo, a traditional Ethiopian sour milk. *International Dairy Journal*, 6, 95-104.
- Ashenafi, M. (2006). A review on the microbiology of indigenous fermented foods and beverages of Ethiopia. *Ethiopian Journal Biological Sciences*, 5(2), 189-245.
- Assefa, E., Beyene, F., & Santhanam, A. (2008). Effect of temperature and pH on the antimicrobial activity of inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated from Ergo, an Ethiopian traditional fermented milk. *African Journal of Microbiology Research*, 2, 229-234.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen & A. von Wright (Eds.). *Lactic acid bacteria – Microbiology and Functional aspects*. (pp. 1-71). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bankole, M. O. & Okagbue, R. N. (1992). Properties of *nono*, a Nigerian fermented milk food. *Ecology of Food and Nutrition*, 27, 145-149.
- Benkerroum, N. & Tamime, A. Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology*, 21, 399-413.
- Benkerroum, N. (2013). Traditional Fermented Foods of North African Countries: Technology and Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12 (1) 59-89.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.

- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S. & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278-285.
- Bernardo, F. A., Brandão, C. F. N. & Mendes, A. M. (1994) O “leite dormido” – (Guiné-Bissau) – subsídio para o estudo da flora microbiana. In Instituto de Investigação Científica Tropical – Centro de Veterinária e Zootecnia (Eds.), *I Jornadas de Leitaria Tropical, Lisboa, Portugal, de 23 a 25 de outubro de 1991*, p. 87-92.
- Beukes, E. M., Bester, B. H. & Mostert, J. F. (2001). The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 189-197.
- Bille, P. G., (2009). Science and technological development of *Omashikwa* Namibian traditional fermented buttermilk. PhD, Doctor of Philosophy. University of Pretoria.
- Bille, P. G., Buys, E. & Taylor, J. R. N. (2007). The technology and properties of *Omshikwa*, a traditional fermented buttermilk produced by small-holder milk producers in Namibia. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 620-640.
- Bonfoh, B., Wasem, A., Traor, A. N., Fan, A., Spillmann, H., Simb, C. F., Alfaroukh, I. O., Nicolet, J., Farah, Z. & Zinsstag, J. (2003). Microbiological quality of cows milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control*, 14, 495–500.
- Bos, C., Gaudichon, C., & Tom, D. (2000). Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans. *Journal American College Nutrition*, 19, 191S- 205S.
- Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C. L., Delboni, R. R. & Oliveira, J. (2004). Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal Microbiology*, 35, 137–144.
- Bruno, L. M. & Carvalho, J. D. G. (2009, dezembro). Microbiota láctica de queijos artesanais. *Embrapa. Agroindustria Tropical*. Documento 124, 9-25
- Buriti, F. C. A. & Saad, S. M. I. (2007). Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Latino Americanos de Nutricion*, 57 (4), 373-380.
- Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
- Caridi, A. (2003). Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 1-6
- Carr, F. J., Chill, D. & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28 (4), 281-370.

- Cenci, G., Rossi, J., Trotta, F. & Caldini, G. (2002). Lactic acid bacteria isolated from dairy products inhibit genotoxic effect of 4-nitroquinoline-1-oxide in SOS-chromotest. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 483-490.
- Chammas, G. I., Saliba, R., Corrieu, G. & Béal, C. (2006). Characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented milk *laban*. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 52-61.
- Chandan, R. C. (2013). History and consumption trends. In R. C. Chandan & A. Kilara (Eds). *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. (2nd ed.) (pp. 1-20). Minnesota: John Wiley & Sons, Inc.
- Claesson, M. J., van Sinderen, D. & O'Toole, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus* a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letter*, 269, 22-28.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Codex STAN 243-2003. Revisado em 2008, 2010. Norma del Codex Alimentarius para leches fermentadas.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M. & Vernoux, J. P. (2003). Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83, 269-306.
- Cogan, T. M. & Hill, C. (1993). Cheese starter cultures. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. (pp. 193-255). London: Chapman & Hall.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Coconcelli, P. S., Fernandez, I., Gómez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M. C. & Rodrigues, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64, 409-421.
- Collado, M.C., Gueimonde, M., Hernandez, M., Sanz, Y. & Salminen, S. (2005). Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal Food Protection*, 68, 2672-2678.
- Coolbear, T., Crow, V. L., Holland, R., Liu, S. Q. & Reid, J. R. (2002) *Lactococcus* spp. "flavours" development. In H. Roginski, J. Fuquay & P. F. Fox (Eds). *Encyclopedia of dairy science* (2nd ed.). (pp.1520-1525). London, UK : Academic Press.
- Corbaci, C., Ucar, F. B. & Yalcin, H. T. (2012). Isolation and characterization of yeasts associated with Turkish-style homemade dairy products and their potential as starter cultures. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (3), 534-542.
- Corsetti, A. & Gobetti, M. (2002). *Lactobacillus plantarum*. In H. Roginski, J. Fuquay & P. F. Fox (Eds). *Encyclopedia of dairy science* (2nd ed.). (pp.1501-1507). London: Academic Press.

- Crittenden, R. G., Matinez, N. R. & Playne, M. J. (2003). Synthesis and utilization of folate by yogurt starter cultures and probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 217-222.
- Cueto, C., Garcia, D., Garcés, F. & Cruz, J. (2007). Preliminary studies on the microbiological characterization of lactic acid bacteria in suero costeño, a Colombian traditional fermented milk product. *Revista Latino Americana de Microbiologia*, 49, 12-18.
- Curry, B. & Crow, V. (2002). *Lactobacillus* spp./General Characteristics. In H. Roginski, J. Fuquay & P. F. Fox (Eds). *Encyclopedia of dairy science*. (2nd ed.). (pp. 1479-1484). London: Academic Press.
- Daniel, C., Poire, S., Goudercouth, D., Dennin, V., Leyer, G. & Pot, B. (2006). Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. *Applied Environmental Microbiology* 72, 5799-5805.
- Danova, S., Petrov, K., Pavlov, P. & Petrova, P. (2005). Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains involved in Kumiss fermentation. *International Journal of dairy Technology*, 58 (2), 100-105.
- Davis, C. D. & Milner, J. A. (2009). Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *Journal Nutrition Biochemistry*, 20 (10),743-752.
- de Vries, M., Vaughan, E., Kleerebezem, M. & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018-1028.
- Dewan, S. & Tamang, J. P. (2007). Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92, 343–352.
- Di Rienzo, D. B. (2013). Effect of probiotics on biomarkers of cardiovascular disease: implications for heart-healthy diets. *Nutrition Reviews*, 72 (1), 18-29.
- Drouault, S. & Corthier, G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research*, 32, 101-117.
- Duboc, P. & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharids in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, 759-768.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolate from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91,861-870.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. & Ogier, J. C. (2008). Bacterial biodiversity of traditional *zabady* fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 295-301.
- El-Gendy, S. M. (1983). Fermented foods of Egypt and Middle East. *Journal of Food Protection*, 46 (4), 358-367.
- El-Marrakchi, A., Hamama, A. & El-Oumami, F. (1993). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and Moroccan dairy products. *Journal Food Protection*, 56, 256-259.

- El-Sharoud, W. M., Belloch, C., Peris, D. & Querol, A. (2009). Molecular Identification of Yeasts associated with traditional Egyptian dairy products. *Journal of Food Science*, 74 (7), 341-346.
- El-Soda, M., El-Ziney, M., Awad, S., Osman, G., Omaran, N., Gamal, G., Ezzat, N. & El-Shafei, H. (2003). A culture collection of lactic acid bacteria isolated from raw milk and traditional Egyptian dairy products. *Egyptian Journal Dairy Science*, 31, 23-41.
- El Zubier, I. E. M., Abdalla, W. M. & El Owni, O. A. O. (2005). Chemical composition of fermented milk (roub and mish) in Sudan. *Food Control*, 16, 633-637
- Falagas, M. E., Betsi, G. I., Tokas, T. & Athanasiou, S. (2006). Probiotics for prevention of recurrent urinary tract infections in women. A Review of the Evidence from Microbiological and Clinical Studies. *Drugs*, 66 (9), 1253-1261.
- Ferusu, S. B. & Muzondo, M. I. (1990). Identification of some lactic acid bacteria from Zimbabwean fermented milk products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6, 178-186.
- Ferusu, S. B. & Nyati, H. (1990). Fate of pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains in two fermented milk products. *Journal Applied Bacteriology*, 69 (6), 814-821.
- Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 199-211.
- Fleet, G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on products quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 170-175.
- Foegeding, P. M., Thomas, A. B., Pilkington, D. H. & Klaenhammer, T. R. (1992). Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (3), 884-890
- Fondén, R., Leporanta, K., & Svensson, U. (2006). Nordic/Scandinavian Fermented milk products. In Adnan Tamime (Ed). *Fermented milks*. (pp.157-171). Singapura: Blackwell Science. COS Printers Pte Ltd.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (1990). The technology of traditional milk products in developing countries. FAO, Rome, Italy. 333pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina. Acedido em abril, 10, 2014, disponível em http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf
- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M. & Mcsweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of cheese science*. (pp 54-96). USA: Aspen Publisher, Inc.

- Franz, C. M., Holzapfel, W. H. & Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1-2.
- Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. & Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88,105-122
- Gadaga, T. H, Mutukumira, A. N. & Narvhus, J. A. (2001). Growth characteristics of *Candida kefyr* and two strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Zimbabwe naturally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 11–19.
- Gadaga, T. H, Nyanga, L. K. & Mutukumira, A. N. (2004). The occurrence, growth and control of pathogens in African fermented foods. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, 4, 1, 5358-5374.
- Gadaga, T. H., Lehohla, M. & Ntuli, V. (2013). Traditional fermented foods of Lesotho. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, 2, (6), 2387-2391.
- Gadaga, T. H., Mutukumira, A. N. & Narvhus, J. A. (2000). Enumeration and identification of yeasts isolated from Zimbabwean traditional fermented milk. *International Dairy Journal*, 10, 459-466.
- Gadaga, T. H., Mutukumira, A. N. & Narvhus J. A. (2001a). The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 21-32.
- Gadaga, T. H., Mutukumira, A. N., Narvhus, J. A. & Feresu, S. B. (1999). A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 1-11.
- Gahan, C. G. M., O’Driscoll, B. & Hill, C. (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3128- 3132.
- Garabal, J. I. (2007). Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. *International Microbiology*, 10, 1-3.
- Ghraiiri, T., Manai, M., Berjeaud, J. M. & Frère, J. (2004). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 621–628
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163-171
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.
- Giraffa, G., Chanishvili, N. & Widyastuti, Y. (2010). Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161, 480-487.
- Gomes, A. F. (2013). Gado e agricultura familiar no sudoeste de Angola. A ecologia da sobrevivência. Tradinense AG.

- Gonfa, A., Fite, A., Urga, K. & Abegaz, B. (1999). Microbiological aspects of *Ergo (Ittitu)* fermentation. *SNET: Ethiopia Journal Science*, 2(22), 238-290.
- Gonfa, A., Foster, H. A. & Holzapfel, W. H. (2001). Field survey and literature review on traditional fermented milk products of Ethiopia. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 173-186.
- Gran, H. M., Mutukumira, A. N., Wetlesen, A. & Narvhus, J. A. (2002). Smallholder dairy processing in Zimbabwe: the production of fermented milk products with particular emphasis on sanitation and microbiological quality. *Food Control*, 13, 161-168.
- Gret (1994). Ministère de la coopération. Créer une petite fromagerie. Expériences et procédés rassemblés. Mémina Sanogo. CTA. Wageningen.
- Hao, Y., Zhao, L., Zhang, H., Huang, Y., Liu, X. & Hang, L. (2010). Identification of the bacterial biodiversity in kumiss by denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific polymerase chain reaction. *Journal Dairy Science*, 93, 1926-1933.
- Hassan, A. N. & Frank, J. F. (2001). Starter cultures and their use. In H.E. Marth & J. L. Steele (Eds.). *Applied Dairy Microbiology*. (2nd Ed). (pp.151-165). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Heyman, M., (2000). Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 19 (2), 137S-146S.
- Holzapfel, W. H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75 197-212.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S- 373 S.
- Huertas, R. A. P. (2010). Review. Bacterias acidolácticas: Papel funcional en los alimentos. *Faculdade de Ciências Agropecuarias, Colombia*, Vol. 8, 1, 93-105.
- Hughenoltz, J. (2008). The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *International Dairy Journal*, 18, 466-475.
- Isono, Y., Shingu, I. & Shimizu, S. (1994). Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from Massai fermented milk in Northern Tanzania. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 58, 660-664.
- Itsaranuwat, P., Al-Haddad, K. S. H. & Robinson, R. K. (2003). The potential therapeutic benefits of consuming “health-promoting” fermented dairy products: a brief update. *International Journal Dairy Technology*, 56 (4), 203-210.
- Iwuoha, C. I. & Eke, O. S. (1996). Nigerian indigenous fermented foods: their traditional process operation, inherent problems, improvements and current status. *Food Research International*, 29 (5 e 6), 527-540.
- Jacques, N. & Casaregola, S. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 321-326.

- Jakobsen, M. & Narvhus, J. A. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*, 6, 755-768.
- Jamaly, N., Benjouad, A., & Bouksaim, M., (2011). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products. *British Microbiology Research Journal*, 1(4), 79-94.
- Jay, M. J. (2000). Modern Food Microbiology. (6th Ed.). (pp.113-119). Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Jespersen, L. (2003). Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Research*, 3, 191- 200.
- Johnson, M. E. & Steele, J. L. (1997) Productos lácteos fermentados. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat & T. F. Montville (Eds). *Microbiologia de los alimentos. Fundamentos y Fronteras*. (pp. 605-610). España: Acribia, Zaragoza.
- Jonkers, D., & Stockbrugger, R. (2003). Probiotics and inflammatory bowel disease. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 96, 167–171.
- Kahala, M., Maki, M., Lehtovaara, A., Tapanainen, J.-M., Katsiska, R., Juuruskorpi, M., Juhola, J. & Joutsjoki, V. (2008). Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product *viili*. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1929-1938.
- Kaktcham, P. M., Zambou, N. F., Tchouanguép, F. M., El-Soda, M. & Choudharyk, M. I. (2012). Antimicrobial and safety properties of Lactobacilli isolated from two Cameroonian traditional fermented foods. *Scientia Pharmaceutica*, 80, 189–203.
- Kebede, A., Viljoen, B. C., Gadaga, T. H., Narvhus, J. A. & Lourens-Hattingh, A. (2007). The effect of container type on the growth of yeast and lactic acid bacteria during production of *Sethemi*, South African spontaneously fermented milk. *Food Research International*, 40, 33-38.
- Khurana, H. K. & Kanawjia, S. K. (2007). Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrient and Food Science*, 3, 91-108.
- Kimonye, J. M. & Robinson, R. K. (1991). *Iria ri matti*- a traditional fermented milk from Kenya. *Dairy Industries International*, 56 (2), 34-35.
- Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 123-131.
- Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (1997). Identification of clinically important Ascomycetous yeasts based on Nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, 35 (5), 1216-1223.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. & Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds by sourdough *Lactobacillus plantarum* 21 B. *Applied & Environmental Microbiology*, 66, 4084-4090.

- Lefoka, M. (2009). The survival of microbial pathogens in dairy products. Magister Scientiae. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of the Free State, Bloemfontein. South Africa.
- Leroy, F. & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15, 67-78.
- Lesbros-Pantoflikova, D., Corthésy-Theulaz, I. & Blum, A. L. (2007). *Helicobacter pylori* and Probiotics. *The Journal of Nutrition*, 137, 812S-818S.
- Leyer, G. J., Wang, L-L. & Johnson, E. A. (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied & Environmental Microbiology*, 61 (10), 3752-3755.
- Limsowtin, G. K. Y., Broome, M. C. & Powell, I. B. (2002). Lactic acid bacteria, taxonomy. In H. Roginski, J. Fuquay & P. F. Fox, (Eds). *Encyclopedia of dairy science*. (2nd ed.). (pp. 1470-1477). London: Academic Press.
- Liong, M. T. & Shah, N. P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of Lactobacilli strains. *Journal Dairy Science*, 88, 55-66.
- Liong, M. T. (2008). Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and in vivo evidence. *International Journal of Molecular Science*, 9, 854-863.
- Ljungh, A. & Wadstrom, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues Intestinal Microbiology*, 7, 73-89.
- Lourens-Hattingh, A. & Viljoen, B. C. (2002). Survival of dairy-associated yeasts in yoghurt and yoghurt-related products. *Food Microbiology*, 19, 597-604.
- López-Díaz, T. M., Alonso, C., Román, C., García-López, M. I., Moreno, B. (2000). Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*, 17, 23-32.
- Mahasneh, A. M. & Abbas, M. M. (2010). Probiotics and traditional fermented foods: the eternal connection (Mini-Review). *Jordan Journal of Biological Sciences*, 3, 133-140.
- Marco, M. L., Pavan, S. & Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion Biotechnology*, 17, 204-210.
- Marschan, E., Kuitunenw, M., Kukkonenw, K., Poussaz, T., Sarnesto, A., Haahtelaw, T., Korpel, R., Savilahti, E. & Vaaralak, O. (2008). Probiotics in infancy induce protective immune profiles that are characteristic for chronic low-grade inflammation. *Clinical and Experimental Allergy*, 38, 611-618.
- Marteau, P. R., de Vrese, M., Cellier, C. J. & Schrezenmeir, J. (2001). Protection gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal Clinical Nutrition*, 73, 4305-4365.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K. & Holzappel, W. H. (2004). Isolation, Identification and characterization of the dominant microorganisms of *kule*

naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 269-278.

- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Guigas, C., Franz, C. & Holzapfel, W. H. (2008). Functional properties of *Lactobacillus plantarum*, strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Curr. Microbiology*, 56, 315-321.
- Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R. & Saarela, M. (2002). Technological challenger for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12, 173-182.
- Mazahreh, A. S. & Ershidat, O. T. M. (2009). The benefits of lactic acid bacteria in yogurt on the gastrointestinal function and health. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8 (9), 1404-1410.
- Messens, W. & De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs – a review. *Int. J. Food Microbiology*, 72, 31-43.
- Michail, S. (2005). The mechanism of action of probiotics. In J. A. Vanderhoof & M. D. Series (Eds.). *Probiotics: The Hope, The Hype and the Reality. Practical Gastroenterology*. (pp. 29-44).
- Miyamoto, T., Gichuru, S. G. G., Akimoto, T. & Nakae, T. (1989). Identification and properties of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented beverages in East Africa. *Jpn. J. Zootech. Science*, 57 (3), 256-276.
- Morais, J. (2004). Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja Guirra para la elaboración de queso. Tese de Doutorado. Barcelona. Universidade Autónoma de Barcelona.
- Mufandaedaza, J., Viljoen, B. C., Fesusu, S. B., & Gadaga, T. H. (2006). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 147-152.
- Musaiger, A., O., Al-Saad, J., A., Al-Hooti D., S. & Khunji Z., A. (1998). Chemical composition of fermented dairy products consumed in Bahrain. *Food Chemistry*, 61 (1/2), 49-52.
- Nagalakshmi, P. K., Sumathi, R., Kanimozhi, K. & Sivakumar, T. (2013). Isolation of bacteriocin nisin producing *Lactococcus lactis* from dairy products. *Journal Academic Industry Research*, 1(10), 627-630.
- Nakasaki, K., Yanagisawa, M. & Kobayashi, K. (2008). Microbiological quality of fermented milk produced by repeated-batch culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105, 73-76.
- Narvhus, J. A. & Gadaga, T. H. (2003). The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 51– 60.

- Narvhus, J. A. (2003). Historical and cultural aspects of traditional fermented milks. In New developments in technology of fermented milk products. Proceedings of the IDF Symposium, (pp.20-33) Kolding, Denmark.
- Nes, I. F. & Holo, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, 55, 50-61.
- Neto, A. C. da R. & Almeida, V. da Silva (2006). Brucelose, peripneumonia contagiosa e enteroparasitoses dos bovinos. In I. Moreira (Ed.). *Angola, Agricultura, Recursos Naturais e Desenvolvimento Rural*. (pp. 451-472). Lisboa. ISA Press.
- Nyatoti, V. S., Mtero, S. S. & Rukure, G. (1997). Pathogenic *Escherichia coli* in traditional African weaning foods. *Food Control*, 8 (1), 51-54.
- Oberman, H. & Libudzisz, Z. (1998). Fermented milks. In B. J. B. Wood (Ed.). *Microbiology of Fermented Foods*. (2nd ed.). (pp. 308–350). London: Blackie Academic & Professional.
- Obi, C. N. & Ikenebomeh, M. J. (2007). Studies on the microbiology and nutritional qualities of a Nigerian fermented milk product *nono*. *International Journal Dairy Science*, 2, 95-99.
- Obodai, M. & Dodd, C. E. R. (2006). Characterization of dominant microbiota of Ghanaian fermented milk product, *nyarmine*, by culture – and nonculture – based methods. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 1355-1363.
- Ogbonna, I. O., David, A. B., Waba, J. T. & Eze, P. C. (2012). Microbiological quality assessments of biradon, kesham and kindrimo: milk products sold in Maiduguri, Nigeria. *International Journal of Dairy Science*, 7 (1), 11-19.
- Ogier, J-C. & Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 291-301.
- Ogier, J. C., Cassalta, E., Farrokh, C. & Saihi, A. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 286-290.
- Ohiokpehai, O. & Jagow, J. (1998). Improving madila – a traditional fermented milk from Botswana. *Intermediate Technology Food Chain*, 23, 3-23.
- Okagbue, R. N. & Bankole, M. O. (1992). Use of starter cultures containing *Streptococcus diacetylatis*, *Lactobacillus brevis* and *Saccharomyces cerevisiae* for fermenting milk for production of Nigerian *nono*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 251-253.
- Okonkwo, O. I. (2011). Microbiological analyses and safety evaluation of *nono*: A fermented milk product consumed in most parts of Northern Nigeria. *International Journal Dairy Science*, 6, 181-189.
- Olasupo, N.A., Schillinger, U. & Holzapfel, W. H. (2001). Studies on some technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *Food Biotechnology*, 15 (3), 157-167.

- Olasupo, N. A., Smith, S. I. & Akinsinde, K. A. (2002). Examination of the microbial status of selected indigenous fermented foods in Nigeria. *Journal Food Safety*, 22, 85-93.
- Ordóñez, J. A., Rodriguez, M.I. C., Álvarez, L. F., Sanz, M. L. G., Minguillón, G. D. G. F., Perales, L. H. & Cortecero, M. D. S. (2005). Tecnología de Alimentos. Alimentos de Origen Animal, Vol 2A, (pp. 67-80). Brasil: Artimed, Editora S. A.
- Ortu, S., Felis, G. E., Marzotto, M., Deriu, A., Molicotti, P., Sechi, L. A. & Dellagio, F. & Zannetti, S. (2007). Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and *Gioddu*, a traditional Sardinian Fermented milk. *International Dairy Journal*, 17, 1312-1320.
- Ouadghiri, M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Naser, S., Gevers, D., Lefebvre, K., Swings J. & Amar, M., (2009). Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk *Iben*. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 486–495.
- Ouwehand, A. C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In S. Salminen & A. von Wright (Eds.). *Lactic acid bacteria. Microbiology and Functional Aspects*. (2nd ed.). (pp. 139-159). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. & Isolauri, E. (2002). Probiotics overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.
- O’Sullivan, M. G., Thornton, G., O’Sullivan, G. C. & Collins, J. K. (1992). Probiotic bacteria: myth or reality. *Trends in Food Science & Technology*, 3, 309–314.
- Patrignani, F., Lanciotti, R., Mathara, J. M., Guerzoni, M. E. & Holzapfel, W. H. (2006). Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 1-11.
- Pool-Zobel, B. I., Neudecker, C., Domizlaff, I., Ji, S., Schillinger, U., Rumney, C., Moretti, M., Vilarin, I., Scassellati-Sforzolini, R. & Rawland, I. (1996). Lactobacillus and bifidobacterium mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutrition and cancer*, 26, 365-380.
- Ramirez, J. C. R., Ulloa, P. R., Gonzalez, M. Y. V., Ulloa, J. A. & Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas. Importancia en alimentos e sus efectos en la salud. *Revista Fuente, Año 2*, (7), 1-15.
- Rashid, Md. H-ur., Togo, K., Ueda, M. & Miyamoto, T. (2007). Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk *dahi* in Bangladesh. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 23, 125–133.
- Reid, G. (2000). In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFMTM as a possible probiotic for the urogenital tract. *International Dairy Journal*, 10, 415-419.
- Rizkalla, S. W., Luo, J., Kabir, M., Chevalier, A., Pacher, N. & Slama, G. (2000). Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breathhydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *American Journal Clinical Nutrition*, 72, 1474–1479.

- Robinson, R. K., Tamime, A. Y. & Wszolek, M. (2002). Microbiology of fermented milks. In R. K. Robinson (Ed). *Dairy Microbiology Handbook*. (pp. 367 – 430). New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Roginski, H. (2002). Fermented milk in Northern Europe. In H., Roginski, J. Fuquay & P. F. Fox (Eds). *Encyclopedia of dairy science*. (2nd ed.). (pp 1034-1040). London: Academic Press.
- Roostita, R. & Fleet, G. H. (1996). The occurrence and growth of yeasts in camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 393-404.
- Saad, S.M. I. (2006). Probióticos e prebióticos: O estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42 (1), 1-16.
- Sahlim, P. (1999). Fermentation as a method of food processing production of organic acids, pH-development and microbial growth in fermenting cereals. Licenciate Thesis. Lund Institute of Techonology. Lund University.
- Saito, T. (2004). Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. *Animal Science Journal*, 75, 1-13.
- Saleh, F. A. (2013). Isolation and identification of microorganism and antibacterial activity of *Laban Zeer* an Egyptian traditional fermented milk product. *Scientific Journal of Microbiology*, 2 (2), 31-42.
- Samaržija, D., Antunac, N. & Havranek, J. L. (2001). Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *MLjekarstvo*, 51 (1) 35-48.
- Samet-Bali, O., Ayadi, M. A. & Attia, H. (2012). Development of fermented milk *Leben* made from spontaneous fermented cow's milk. *African Journal of Biotechnology*, 11(7), 1829-1837.
- Sanders, M. (2003). Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Reviews*, 61, 91-99.
- Sarkar, S. (2008). Inovations in Indian fermented milk products – A Review. *Food Biotechnology*, 22, 78-97.
- Savado, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N. & Traoré, A. S. (2004b). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (3), 174-179.
- Savado, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N. & Traoré, A. S. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5 (9), 678-683.
- Savado, A., Ouattara, C. A.T., Savado, P. W., Barro, N., Ouattara, A. S. & Traoré, A. S. (2004a). Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*, 3 (3), 189-194.

- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Savadogo, P.W., Ouattara, A. S., Barro, N. & Traoré, A. S. (2004). Microorganisms involved in Fulani traditional fermented milk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (2), 134-139.
- Schutte, L. M. (2013). Isolation and identification of the microbial consortium present in fermented milks from sub-saharan Africa. Master of Science. University of Stellenbosch, South Africa.
- Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., & Mentis, A. (2004). In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (1), 518-526.
- Shah, N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17, 1262-1277.
- Shuangqua, N., Burentegusi, I., Yu, B. & Miyamoto, T. (2006). Microflora in traditional starter cultures for fermented milk, *hurunge*, from Inner Mongolia, China. *Animal Science Journal*, 77, 235-241.
- Simango, C. & Rukure, G. (1992). Survival of bacterial enteric pathogens in traditional fermented foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 37- 40.
- Solga, S. F. (2003). Probiotics can treat hepatic encephalopathy. *Medical Hypotheses*, 61 (2), 307-313.
- Solomons, N. W. (2002). Fermentation, fermented foods and lactose intolerance. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, Suppl 4, 550-555.
- Sserunjogi, M. L., Abrahamsen, R. K. & Narvhus, J. (1998). A review paper: current knowledge of ghee and related products. *Int. Dairy Journal*, 8, 677-688.
- Stanley, G. (1998). Microbiología de los productos lácteos fermentados. In R. Early (Ed.) *Tecnología de los productos lácteos*. (2nd Ed.). (pp. 51- 80). España: Editorial Acribia, S. A.
- Stevenson, C. & Blaauw, R. (2011). Probiotics, with special emphasis on their role in the management of irritable bowel syndrome. *South African Journal Clinical Nutrition*, 24 (2), 63-73.
- Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Suleiman, A. M. H. & Tsenkova, R. (2007). Manufacture and quality of fermented milks prepared using pure strains of lactic acid bacteria (LAB) and yeast. *Research Journal of Microbiology*, 2 (9), 684-689.
- Sulieman, A. M. E., Dirar, H. A., Elkhalfa, E. A. & Ali, A. O. (2009). Effect of fermentation on some chemical components of the Sudanese fermented butter milk, *rob* Sudan *Journal of Science and Technology*, 10, 41-50.

- Suzuki, K-I., Sasaki, J., Uramoto, M., Nakase, T. & Komagata, K. (1996). *Agromyces mediolanus* sp. nov., nom. rev., comb. nov., a species for “*Corynebacterium mediolanum*” Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating bacteria which contain 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46 (1), 88-93.
- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M. E., Andrighetto, C., Lanorte, M. T. (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*, 89, 267-274.
- Tamang, J. P. & Fleet, G. H. (2007). Yeasts diversity in fermented food and beverages. In T. Satyanarayana & G. Kunze (Eds). *Yeasts Biotechnology Diversity and Applications*. (pp. 169-189). New Delhi. Springer. <https://www.google.pt/#q=yeasts+diversity+in+fermented+food+and+beverages...> acedido aos 20 de janeiro.
- Tamime, A. Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, Suppl. 4, S2-S15.
- Tamime, A. Y. (2002a). Microbiology of starter cultures. In R. K. Robinson (Eds). *Dairy Microbiology Handbook. The microbiology of milk and milk products*. (3rd ed.). (pp. 261-347). New York: John Willey and Sons, Inc.
- Tannock, G. W. (2004). A special fondness for Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3189-3194.
- Tantaoui-Elaraki, A. & El Marrakchi, A. (1987). Study of the Moroccan dairy products : *Lben* and *smen*. *World J Microbiol Biotechnol (Ex Mircen Journal)*, 3, 211–220.
- Terzic-Vidojevic, A., Tolinacki, M., Nikolic, M., Lozo, J., Begovic, J., Gulahmadov, S. G. O., Kuliev, A. A., Dalgarrondo M., Chobert, J-M., Haertlé, T. & Topisirovic, L. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Azerbaijani traditional dairy products. *African Journal of Biotechnology*, 8 (11), 2576-2588.
- Teuber, M. & Geis, A. (2006). The genus *Lactococcus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer & E. Stackebrandt (Eds). *Prokariotes*. Vol. 4, (pp. 205-228). Springer. <http://books.google.pt/books?Id=csTzL Bab Uh8c&pg>. acedido aos 22 de abril 2014.
- Todorov, S. D. & Franco, B. D. G. de M. (2010). *Lactobacillus plantarum*. Characterization of the species and application in food production. *Food Reviews International*, 26, 205-229.
- Todorov, S. D., Nyati, H., Meincken, M. & Dicks, L.M.T. (2007). Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control*, 18, 656-664.
- Uchida, K., Urashima, T., Chanishvili, N., Arai, I. & Motoshima H. (2007). Major microbiota of lactic acid bacteria from *Matsoni*, a traditional Georgian fermented milk. *Animal Science Journal*, 78, 85-91.
- Uzeh, R. E., Ohenhen, R. E. & Rojgbokan, A. K. (2006). Microbiological and nutritional qualities of dairy products: *Nono* and *Wara*. *Nature and Science*, 4 (3), 37-40.

- Vasdinyei, R. & Deák, T. (2003). Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 123-130.
- Viljoen, B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 53-58.
- Vlieg, J. E.T.van H. & Hugenholtz, J. (2007). Mining natural diversity of lactic acid bacteria for “flavours” and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1290-1297.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A. & van Boekel, M. A. J. S. (2001). Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. España, Editorial Acribia, S. A.
- Wang, S. Y., Chen, H. C., Dai, T. Y., Huang, N. I., Liu, J. R. & Chen, M. J. (2011). Identification of lactic acid bacteria in Taiwanese ropy fermented milk and evaluation of their microbial ecology in bovine and caprine milk. *Journal Dairy Science*, 94, 623-635.
- Ward, L. J. H., Davey, G. P. & Heap, H. A. (2002). *Lactococcus* spp./*Lactococcus lactis*. In H. Roginski, J. Fuquay & P. F. Fox (Eds). *Encyclopedia of dairy science*. (2nd ed.). (pp. 1511-1513). London : Academic Press.
- Watanabe, K., Fujimoto, J., Sasamoto, M., Jamyán, D., Tseveendori, T. & Shirchin, D. (2008). Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in airag and tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. *World Journal Microbiol Biotechnology*, 24, 1313–1325.
- Westall, S. & Filtenborg, O. (1998). Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiology*, 15, 215-222
- Willey, J. M., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley and Klein’s Microbiology. Seventh Edition. The McGraw-Hill Companies – Higher Education. New York.
- Williams, A. M., Fryer, J. L. & Collins, M. D. (1990). *Lactococcus piscium* sp. Nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters*, 68, 109-114.
- Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J. & Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 91-109.
- Wullschleger, S., Lacroix C., Bonfoh, B., Sissoko-Thiam, A., Hugenschmidt, S., Romanens, E., Baumgartner, S., Traoré, I., Yaffee, M., Jans, C. & Meile, L. (2013). Analysis of lactic acid bacteria communities and their seasonal variations in a spontaneously fermented dairy product (Malian fènè) by applying a cultivation/genotype-based binary model. *International Dairy Journal*, 29, 28-35.
- Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B. & Al-Daher, R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International Journal of Dairy Science*, 34, 194-199.
- Yi, H., Zhang, L., Han, X., Du M. Zhang, Y., Li, J., Sun, K., & Hou, Y. (2011). Isolation and applied potential of lactic acid bacteria from Chinese traditional fermented food in specific ecological localities. *Food Science Biotechnology*, 20 (6), 1685-1690.

- Yilma, Z. & Faye, B. (2006). Handling and microbial load of cow's milk and *Irgo* – fermented milk collected from different shops and producers in central highlands of Ethiopia. *Ethiopian Journal Animal Production*, 6 (2), 67-82.
- Yilma, Z. (2012). Microbial properties of ethiopian marketed milk and milk products and associated critical points of contamination: An Epidemiological perspective. In M. de L. R. de S. Cunha (Ed). *Epidemiology Insights*. (pp. 297-322). InTechopen,
- Yilma, Z., Faye, B. & Loiseau, G. (2007). Occurrence and distribution of species of Enterobacteriaceae in selected Ethiopian traditional dairy products: A contribution to epidemiology. *Food Control*, 18, 1397-1404.
- Yu, J., Wang, W. H., Menghe, B. L. G., Jiri, M. T., Wang, H. M., Liu, W.J., Bao, Q. H., Lu, Q., Zhang, J. C., Wang, F., Xu, H. Y., Sun, T. S. & Zhang, H. P. (2011). Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *Journal of Dairy Science*, 94, 3229-3241.
- Zambou, N. F., El Hoda, N., Fonteh, A. F., Moundipa, F. P., Mbiapo, T. F. & El-Soda, M. (2007). Biochemical properties of some thermophilic lactic acid bacteria from traditional fermented milk relevant to their properties as starter culture. *Biotechnology*, 6(1), 14-21.
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Bruno, P., Swings, J. & De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 487-495.

ANEXOS

Anexo1

Teores médios de microrganismos isolados em amostras de *omavele* (\log_{10} ufc/mL).

Amostra	Localidades	Lactobacilos	Lactococos	Leveduras	Aeróbios Totais a 30°C
1	Rio da Areia	7,98	6,68	6,61	-
2	Rio da Areia	7,16	6,43	6,30	-
3	Rio da Areia	4,97	4,57	4,43	6,34
4	Rio da Areia	6,28	5,23	6,00	6,97
5	Rio da Areia	7,49	6,76	5,91	7,15
6	Rio da Areia	5,57	5,69	5,34	5,85
7	Rio da Areia	6,53	5,59	5,32	5,57
8	Rio da Areia	6,31	6,34	4,98	5,81
9	Rio da Areia	6,34	6,18	5,96	6,23
10	Rio da Areia	5,59	5,41	6,59	6,84
11	Rio da Areia	6,29	5,10	5,21	5,44
12	Rio da Areia	6,54	5,30	5,30	5,74
13	Rio da Areia	6,77	5,72	5,44	5,49
14	Mulondo	6,70	6,53	6,81	-
15	Mulondo	6,95	6,74	6,67	-
16	Mulondo	7,66	6,21	6,12	-
17	Mulondo	7,58	8,00	6,59	-
18	Mulondo	7,27	6,03	5,92	-
19	Chibia	7,22	6,84	5,48	-
20	Chibia	7,20	6,65	6,00	-
21	Chibia	6,57	5,72	6,67	6,26
22	Chibia	5,85	6,65	2,64	6,58
23	Chibia	5,93	6,94	6,82	7,79
24	Chibia	8,19	5,82	6,93	7,74
25	Chibia	7,22	7,30	6,11	6,23
26	Chibia	6,87	6,05	5,95	5,33
27	Chibia	7,26	7,32	5,89	5,97
28	Chibia	6,81	5,58	6,04	7,23
29	Chibia	7,06	6,37	5,54	5,15
30	Chibia	7,09	5,90	5,48	6,33
31	Humpata	7,93	7,18	7,19	-
32	Humpata	7,57	7,15	6,63	-
33	Humpata	6,97	6,23	6,28	7,30
34	Humpata	7,28	7,08	7,24	8,01
35	Humpata	7,36	7,54	5,34	7,65
36	Humpata	6,42	6,38	5,56	6,79
37	Humpata	7,16	8,34	5,43	7,73
38	Humpata	6,64	6,92	5,56	6,90
39	Humpata	6,73	6,72	5,46	6,81
40	Toco	6,02	6,30	5,99	-
41	Toco	6,22	7,32	6,26	6,10
42	Toco	7,39	7,12	6,95	6,26
43	Toco	5,77	4,67	5,73	5,98
44	Toco	5,83	5,06	5,32	5,69
45	Toco	6,88	6,83	6,18	7,08
46	Toco	6,72	5,94	5,23	5,84
47	Toco	6,76	4,74	5,30	5,36
48	Toco	6,72	5,53	5,70	5,94
49	Toco	6,05	5,54	5,28	5,92
50	Toco	6,07	5,54	5,46	5,00
51	Toco	6,71	4,91	5,60	5,65
52	Toco	7,39	5,84	5,04	5,93
53	Toco	7,06	5,94	5,45	5,47
54	Toco	7,12	5,22	5,19	5,39
55	Huíla	7,23	5,15	5,23	7,32
56	Huíla	7,09	7,09	6,48	6,36
57	Huíla	7,19	7,45	5,39	5,34

Teores médios de microrganismos isolados em amostras de *omavele* (\log_{10} ufc/mL).

Amostra	Localidades	Micrococos	Enterococos	Enterobactérias
1	Rio da Areia	3,78	3,32	-
2	Rio da Areia	3,93	4,00	-
3	Rio da Areia	3,69	3,97	3,01
4	Rio da Areia	2,48	4,26	3,49
5	Rio da Areia	-	3,47	2,74
6	Rio da Areia	2,28	3,98	2,30
7	Rio da Areia	3,92	4,28	2,38
8	Rio da Areia	3,19	3,45	3,57
9	Rio da Areia	-	4,40	2,93
10	Rio da Areia	3,68	3,26	3,65
11	Rio da Areia	2,48	4,11	-
12	Rio da Areia	-	3,75	3,66
13	Rio da Areia	-	3,82	-
14	Mulondo	5,88	4,74	-
15	Mulondo	-	-	-
16	Mulondo	2,08	4,45	-
17	Mulondo	5,56	4,74	-
18	Mulondo	3,38	2,74	-
19	Chibia	4,24	2,78	-
20	Chibia	4,12	3,90	-
21	Chibia	2,95	3,65	2,88
22	Chibia	3,76	4,26	2,28
23	Chibia	-	4,88	3,44
24	Chibia	-	6,10	-
25	Chibia	4,81	5,87	2,72
26	Chibia	-	4,58	-
27	Chibia	4,91	5,33	4,62
28	Chibia	4,48	5,49	-
29	Chibia	4,69	4,60	-
30	Chibia	3,87	4,85	-
31	Humpata	2,89	3,68	-
32	Humpata	4,85	6,30	-
33	Humpata	2,55	3,53	5,15
34	Humpata	-	6,29	-
35	Humpata	-	5,65	-
36	Humpata	-	6,94	-
37	Humpata	-	5,49	-
38	Humpata	-	5,97	-
39	Humpata	4,33	5,20	-
40	Toco	-	4,86	2,90
41	Toco	-	4,29	1,95
42	Toco	-	5,89	-
43	Toco	2,53	3,92	2,34
44	Toco	2,65	3,79	-
45	Toco	3,61	4,73	-
46	Toco	3,89	3,62	2,15
47	Toco	-	2,86	3,18
48	Toco	4,08	3,15	2,65
49	Toco	-	3,54	3,68
50	Toco	-	3,59	-
51	Toco	-	3,94	-
52	Toco	-	5,60	-
53	Toco	-	3,93	-
54	Toco	-	3,87	-
55	Huíla	3,42	6,50	6,76
56	Huíla	4,34	6,02	3,28
57	Huíla	3,76	4,97	3,76

Análise Estatística

A variável resposta analisada (y) foi o logaritmo de base 10 das contagens bacterianas para cada uma das 7 variáveis (Lactobacilos, Lactococos, Leveduras, Aeróbios Totais a 30°C, Micrococos, Enterococos e Enterobactérias) considerando a totalidade da amostra e dividindo-a por ano e por localidade. Este procedimento permitiu normalizar a variável analisada. Para o factor ano foram considerados 4 níveis (2007, 2008, 2009 e 2010) e para o factor localidade foram considerados 6 níveis (Chibia, Huíla, Humpata, Mulondo, Rio da Areia e Toco). A interação entre ambos os fatores não foi considerada. As diferenças entre as médias foram examinadas através do teste post-hoc HSD de Tukey.

A análise de dados foi realizada com recurso ao *software* estatístico R, versão 2.15.0.

Para avaliarmos o efeito dos fatores ano e localidade nas sete variáveis recorreu-se à ANOVA *two-way* em que o modelo de análise foi $y = \mu + \text{ano} + \text{localidade} + \text{erro}$.

Os calculos foram realizados com o pacote estatístico R, versão 2. 15.0

Variável Lactobacilos

Analysis of Variance Table

Response: log10(LACTOB)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ANO	3	6.7816	2.26053	7.3961	0.00036 ***
LOCALIDADE	5	2.2246	0.44491	1.4557	0.22187
Residuals	48	14.6705	0.30564		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Factor ano significativo ($p < 0.001$).

ANO

	log10.LACTOB.	std.err	r	Min.	Max.
2007	7.383760	0.11984831	11	6.698970	7.977724
2008	6.593574	0.33298887	7	5.845098	8.190332
2009	6.456677	0.14617452	21	4.973128	7.494155
2010	6.920089	0.07418293	18	6.290035	7.389166

Groups, Treatments and means

a	2007	7.384
ab	2010	6.92
b	2008	6.594
b	2009	6.457

Means with the same letter are not significantly different.

As médias do mesmo grupo não diferem significativamente ($p < 0.05$).

LOCALIDADE, means

	log10.LACTOB.	std.err	r	Min.	Max.
Chibia	6.938766	0.18073106	12	5.845098	8.190332
Huila	7.169610	0.03983639	3	7.093422	7.227887
Humpata	7.117350	0.15960362	9	6.423246	7.929419
Mulondo	7.232083	0.18328970	5	6.698970	7.662758
Rio-Areia	6.448798	0.22393418	13	4.973128	7.977724
Toco	6.580215	0.14172400	15	5.770852	7.389166

Means with the same letter are not significantly different.

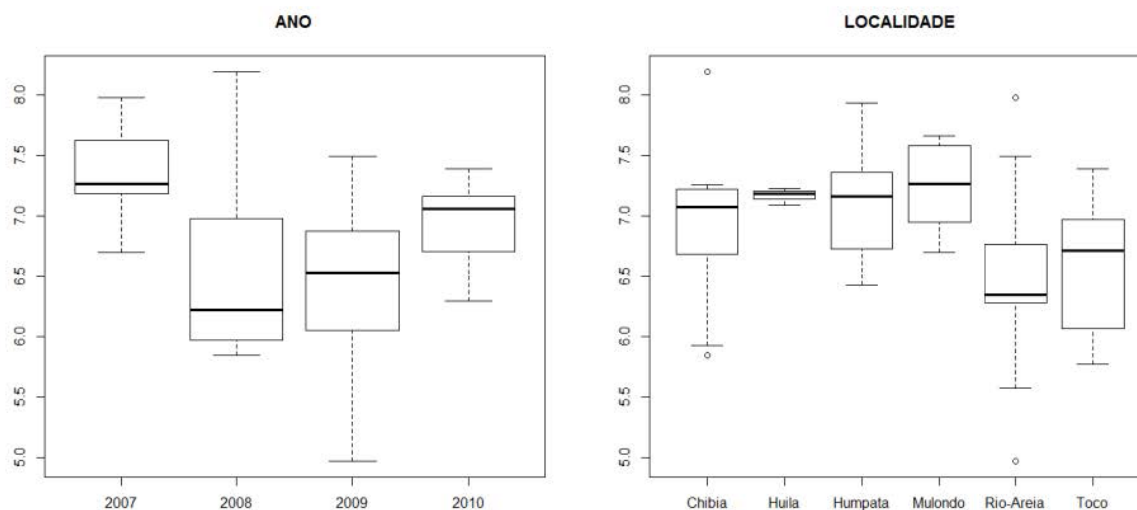
Groups, Treatments and means

a	Mulondo	7.232
a	Huila	7.17
a	Humpata	7.117
a	Chibia	6.939
a	Toco	6.58
a	Rio-Areia	6.449

Neste caso todas as médias pertencem ao mesmo grupo.

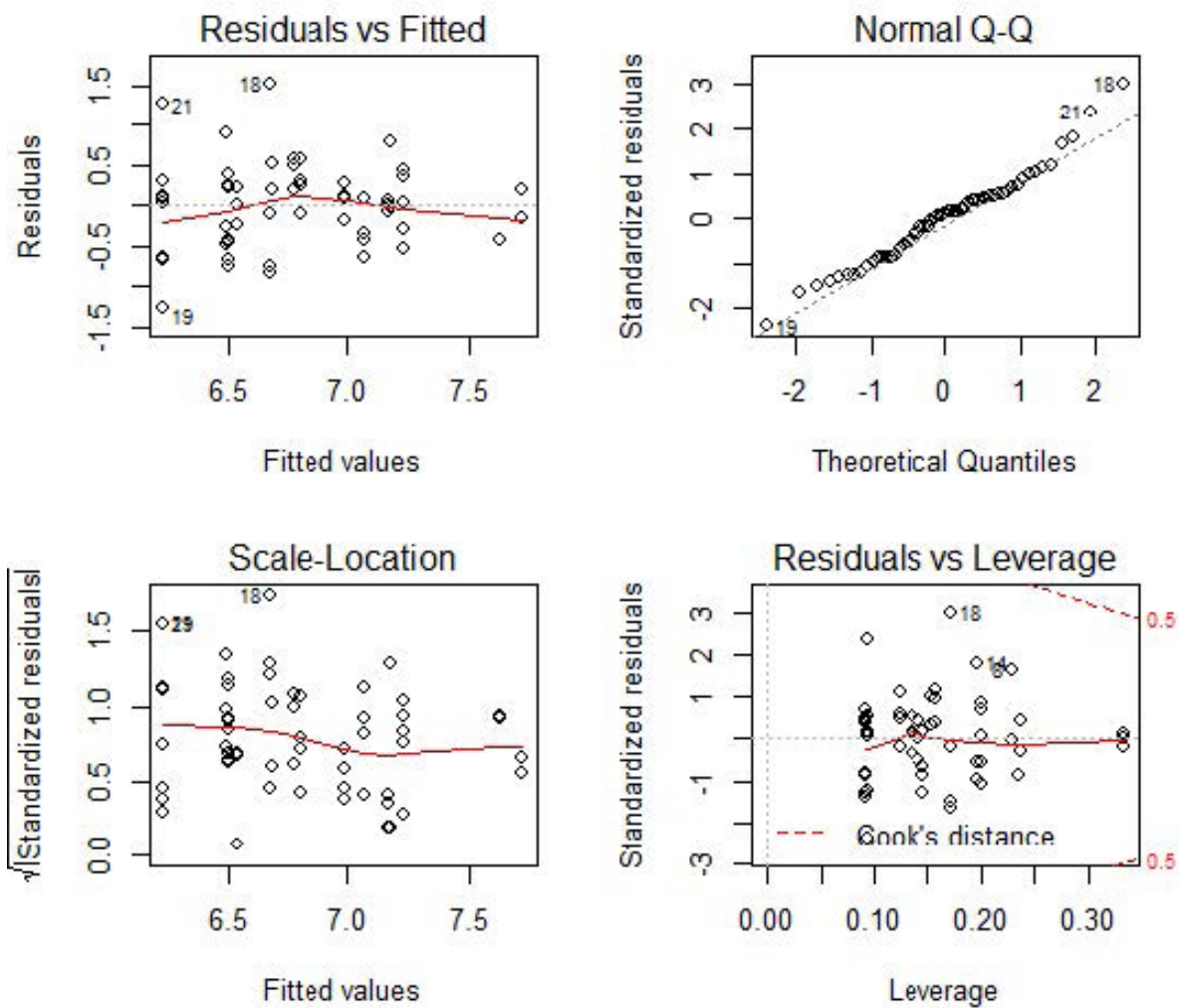
Condições de aplicabilidade da ANOVA

Boxplots



Não se verificam desvios importantes à normalidade dentro dos grupos.

Análise de resíduos



De acordo com o gráfico valores ajustados Vs resíduos, a homogeneidade da variância não é violada (os resíduos distribuem-se ao acaso acima e abaixo da linha). O Q-Q plot sugere normalidade, ao ajustarem-se os valores a uma linha reta. No conjunto há condições de aplicabilidade da análise de variância.

Variável Lactococos

Analysis of Variance Table

Response: log10(LACTOB)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ANO	3	6.7816	2.26053	7.3961	0.00036 ***
LOCALIDADE	5	2.2246	0.44491	1.4557	0.22187
Residuals	48	14.6705	0.30564		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Factor ano significativo ($p < 0.05$) e factor localidade significativo ($p < 0.01$).

ANO, means

	log10.LACTOC.	std.err	r	Min.	Max.
2007	6.769009	0.1619036	11	6.033424	8.000000
2008	6.553763	0.2380398	7	5.720159	7.322219
2009	5.896473	0.1862250	21	4.568202	7.537819
2010	6.180055	0.2263883	18	4.908485	8.342423

Groups, Treatments and means

a	2007	6.769
ab	2008	6.554
ab	2010	6.18
b	2009	5.896

Médias do mesmo grupo ou com o mesmo superíndice não diferem significativamente ($p < 0.05$).

LOCALIDADE, means

	log10.LACTOC.	std.err	r	Min.	Max.
Chibia	6.428489	0.1764193	12	5.579784	7.322219
Huila	6.563117	0.7129132	3	5.152288	7.447158
Humpata	7.060408	0.2102814	9	6.230449	8.342423
Mulondo	6.703491	0.3465727	5	6.033424	8.000000
Rio-Areia	5.769440	0.1843008	13	4.568202	6.755875
Toco	5.767154	0.2146531	15	4.672098	7.322219

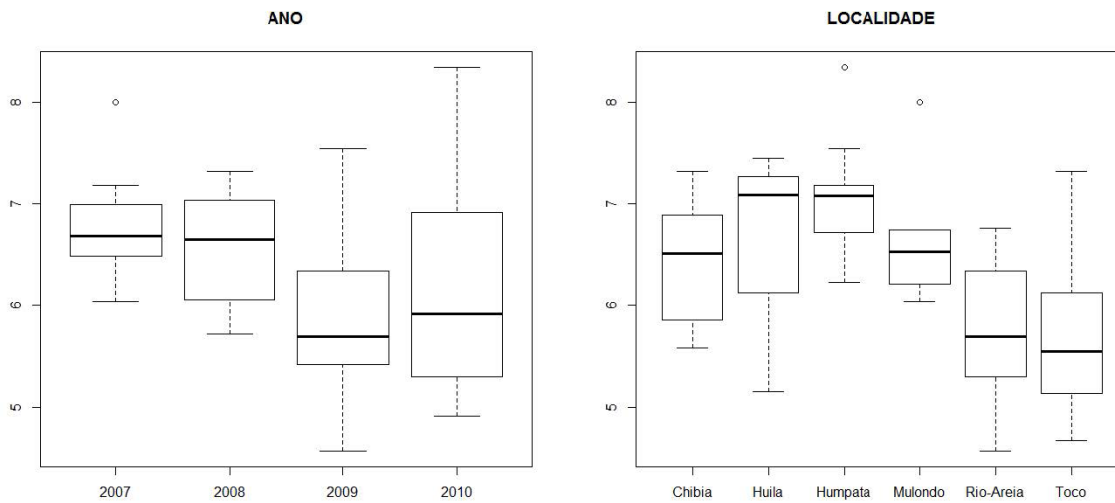
Groups, Treatments and means

a	Humpata	7.06
ab	Mulondo	6.703
ab	Huila	6.563
ab	Chibia	6.428
b	Rio-Areia	5.769
b	Toco	5.767

Médias do mesmo grupo ou com o mesmo superíndice não diferem significativamente ($p < 0.05$)

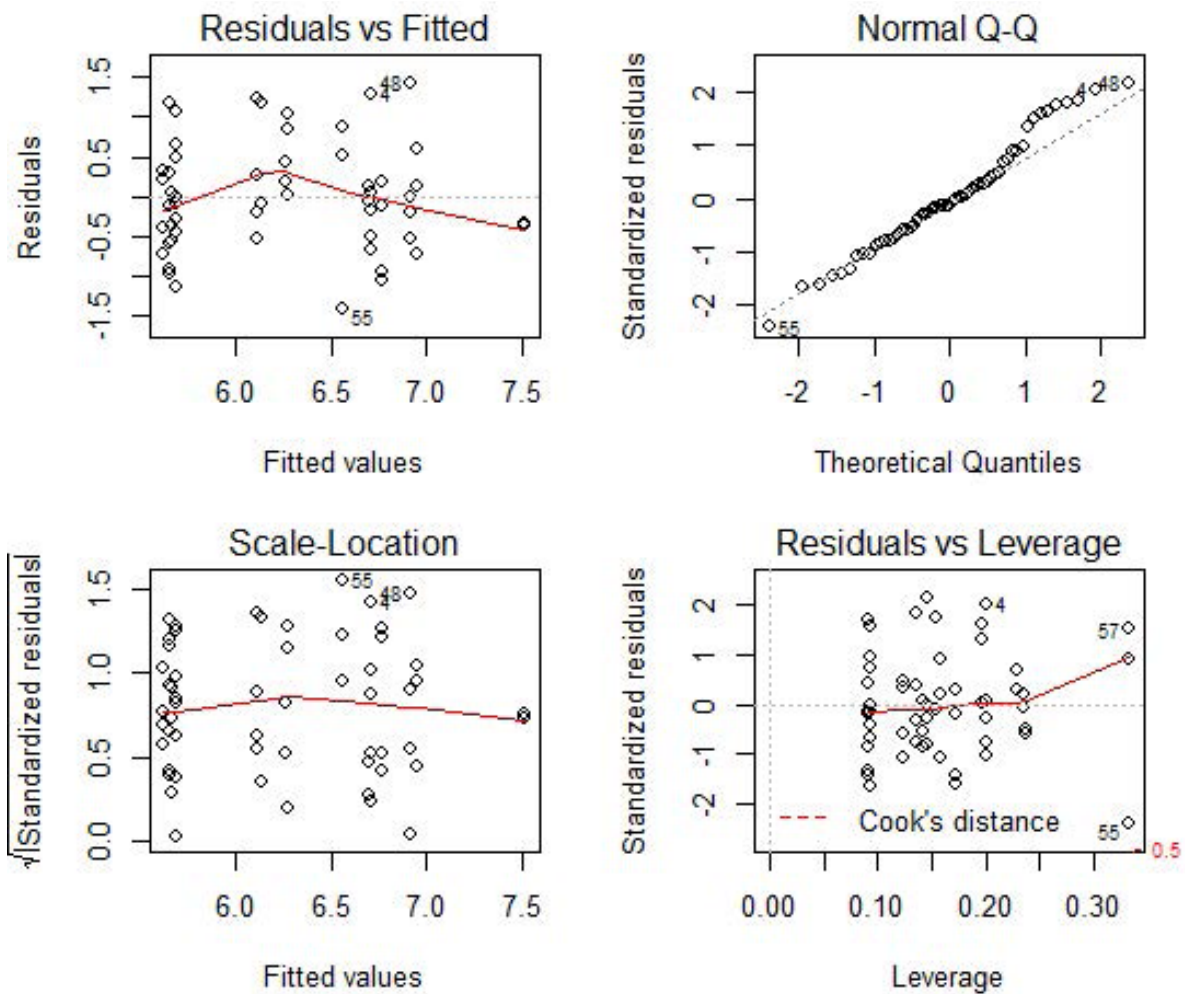
Condições de aplicabilidade da ANOVA

Boxplots



Mulondo foi o único nível que apresentou um certo desvio da normalidade, mas sem qualquer importância se tivermos em consideração o conjunto.

Análise de resíduos



Pelas mesmas razões expostas para a variável anterior, confirmam-se as condições de aplicabilidade da análise de variância

Variável Leveduras

ANOVA com *outlier* incluído.

Analysis of Variance Table

Response: log10(LEVEDURES)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ANO	3	5.9140	1.97134	3.8542	0.0150 *
LOCALIDADE	5	1.4071	0.28142	0.5502	0.7373
Residuals	48	24.5511	0.51148		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Apenas o factor ano é significativo ($p < 0.05$).

ANO, means

	log10.LEVEDURES.	std.err	r	Min.	Max.
2007	6.393708	0.14579141	11	5.477121	7.193125
2008	6.035693	0.58214755	7	2.638489	6.946943
2009	5.697667	0.13304123	21	4.431364	7.235528
2010	5.516842	0.07988013	18	5.041393	6.484300

Groups, Treatments and means

a	2007	6.394
ab	2008	6.036
ab	2009	5.698
b	2010	5.517

Médias do mesmo grupo ou com o mesmo superíndice não diferem significativamente ($p < 0.05$).

LOCALIDADE, means

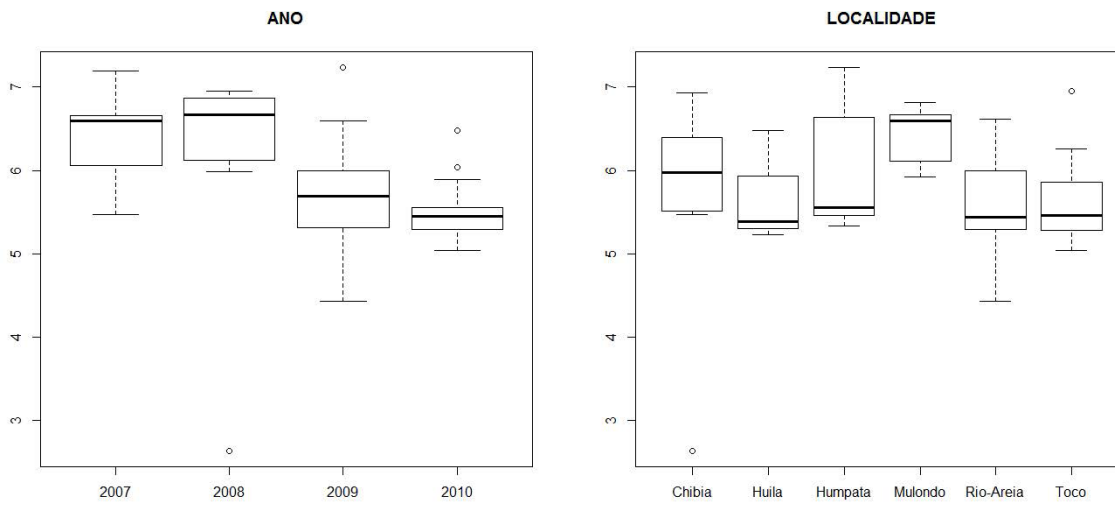
	log10.LEVEDURES.	std.err	r	Min.	Max.
Chibia	5.796264	0.3204588	12	2.638489	6.926857
Huila	5.702577	0.3934111	3	5.234264	6.484300
Humpata	6.076629	0.2585945	9	5.342423	7.235528
Mulondo	6.423525	0.1709560	5	5.924279	6.812913
Rio-Areia	5.645746	0.1792461	13	4.431364	6.612784
Toco	5.644661	0.1320067	15	5.041393	6.946943

Groups, Treatments and means		
a	Mulondo	6.424
a	Humpata	6.077
a	Chibia	5.796
a	Huila	5.703
a	Rio-Areia	5.646
a	Toco	5.645

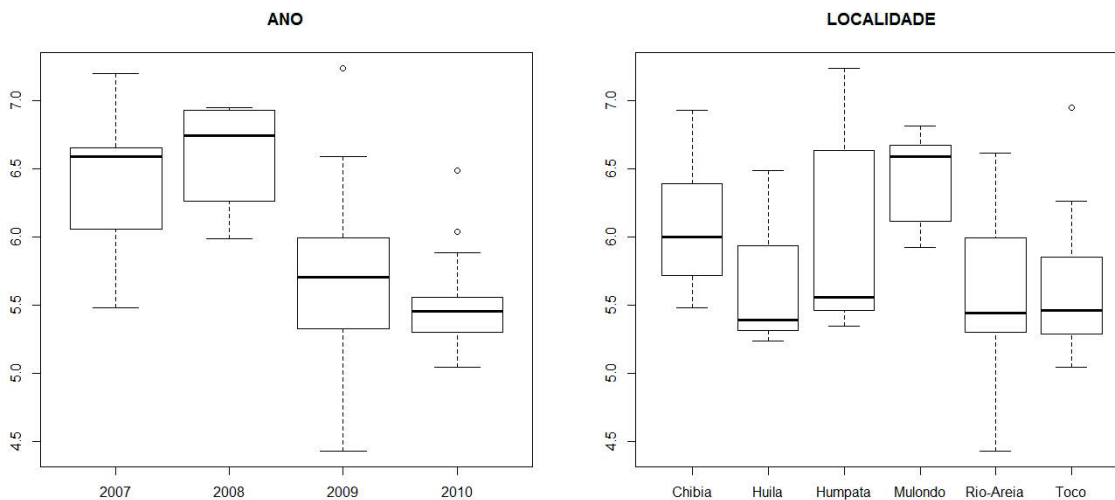
Médias do mesmo grupo ou com o mesmo superíndice não diferem significativamente ($p < 0.05$).

Condições de aplicabilidade da ANOVA

Boxplots



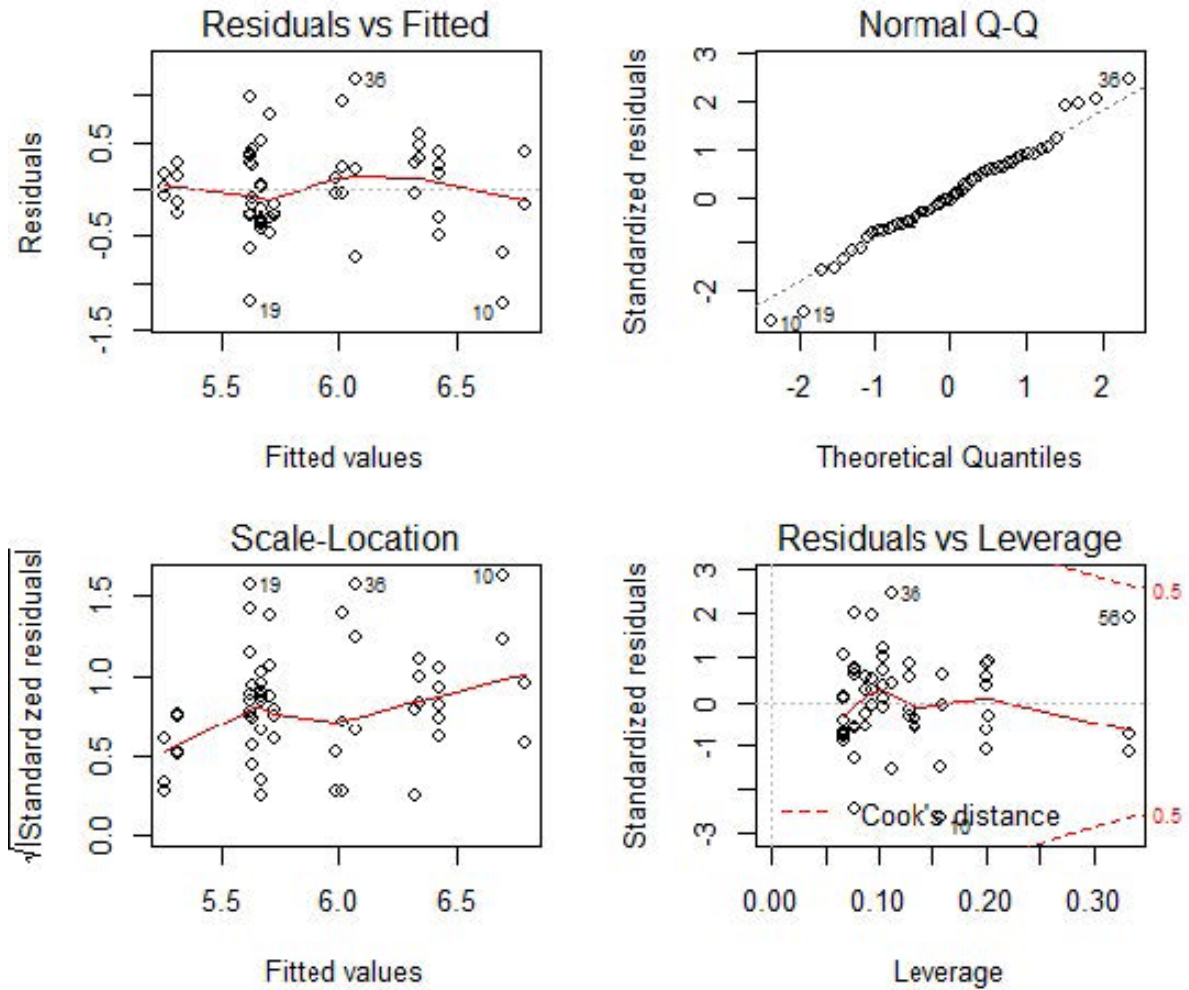
No geral não se verificam desvios importantes à normalidade, se bem que uma observação poderia considerar-se *outlier*. Após a sua eliminação o *boxplot* ficou da seguinte maneira :



Mesmo neste caso aparecem alguns *outliers*, mas não são tão extremos e decidiu-se mantê-los para a análise.

Análise de resíduos

Após a eliminação da observação extrema, *outlier*, há condições de aplicabilidade da ANOVA, tal como se pode observar nos gráficos que se seguem.



Estudo realizado após a eliminação do *outlier*:

Analysis of Variance Table

Response: log10(LEVEDURES)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ANO	1	7.4688	7.4688	30.1035	1.431e-06 ***

LOCALIDADE	5	1.9669	0.3934	1.5855	0.1817
------------	---	--------	--------	--------	--------

Residuals	49	12.1571	0.2481		
-----------	----	---------	--------	--	--

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

A variável ano volta a ser significativa ($p < 0.001$), as diferenças entre localidades não são significativas.

ANO, means

	log10.LEVEDURES.	std.err	r	Min.	Max.
2007	6.393708	0.14579141	11	5.477121	7.193125
2008	6.601894	0.16011766	6	5.986772	6.946943
2009	5.697667	0.13304123	21	4.431364	7.235528
2010	5.516842	0.07988013	18	5.041393	6.484300

Groups, Treatments and means

a	2008	6.602
a	2007	6.394
b	2009	5.698
b	2010	5.517

Não se verificam diferenças significativas entre os anos 2007 e 2008, mas sim entre os anos 2009 e 2010.

LOCALIDADE, means

	log10.LEVEDURES.	std.err	r	Min.	Max.
Chibia	6.083335	0.1560169	11	5.477121	6.926857
Huila	5.702577	0.3934111	3	5.234264	6.484300
Humpata	6.076629	0.2585945	9	5.342423	7.235528
Mulondo	6.423525	0.1709560	5	5.924279	6.812913
Rio-Areia	5.645746	0.1792461	13	4.431364	6.612784
Toco	5.644661	0.1320067	15	5.041393	6.946943

Groups, Treatments and means

a	Mulondo	6.424
ab	Chibia	6.083
ab	Humpata	6.077
ab	Huila	5.703
b	Rio-Areia	5.646
b	Toco	5.645

Neste caso existem diferenças, provavelmente devido à maior sensibilidade do teste de Tukey. Não obstante, dado que no teste ANOVA não se verificaram diferenças significativas, considera-se que as médias das diferentes localidades não diferem significativamente.

Variável Micrococos

Analysis of Variance Table

Response: log10 (MICROCUS)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ANO	3	4.2822	1.42740	1.6639	0.2002
LOCALIDADE	5	2.7125	0.54249	0.6324	0.6768
Residuals	25	21.4462	0.85785		

Não se verificam diferenças significativas para a variável micrococos para nenhum dos fatores.

ANO, means

	log10.MICROCUS.	std.err	r	Min.	Max.
2007	4.070288	0.3660792	10	2.079181	5.880814
2008	3.359583	0.4053402	2	2.954243	3.764923
2009	3.334375	0.2161864	13	2.278754	4.812913
2010	4.031223	0.2493854	9	2.477121	4.908485

Groups, Treatments and means

a	2007	4.07
a	2010	4.031
a	2008	3.36
a	2009	3.334

LOCALIDADE, means

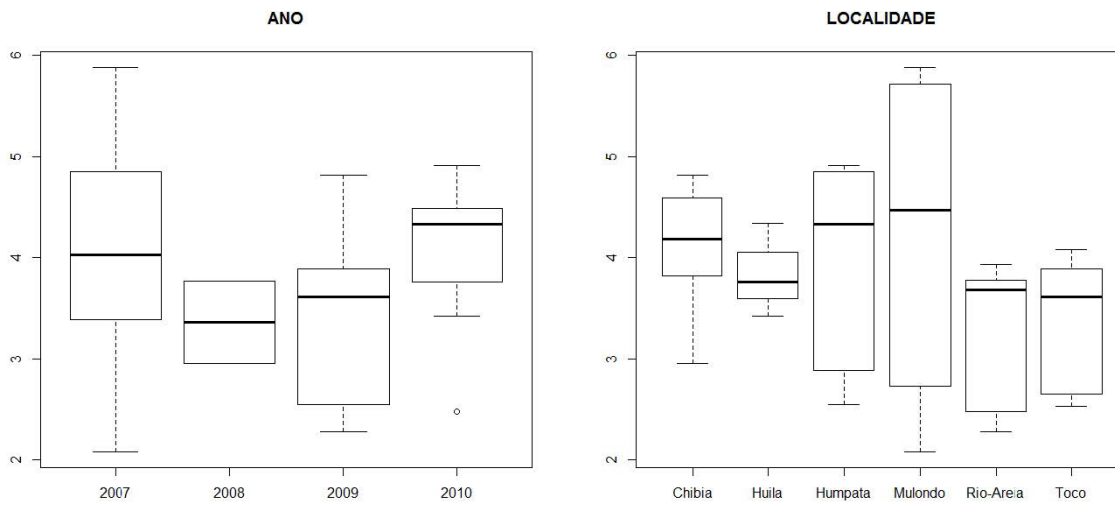
	log10.MICROCUS.	std.err	r	Min.	Max.
Chibia	4.117427	0.2113311	8	2.954243	4.812913
Huila	3.841779	0.2685009	3	3.423246	4.342423
Humpata	3.903328	0.4970434	5	2.550228	4.908485
Mulondo	4.225028	0.9049040	4	2.079181	5.880814
Rio-Areia	3.268249	0.2266642	9	2.278754	3.929419
Toco	3.350837	0.3190619	5	2.531479	4.075547

Groups, Treatments and means

a	Mulondo	4.225
a	Chibia	4.117
a	Humpata	3.903
a	Huila	3.842
a	Toco	3.351
a	Rio-Areia	3.268

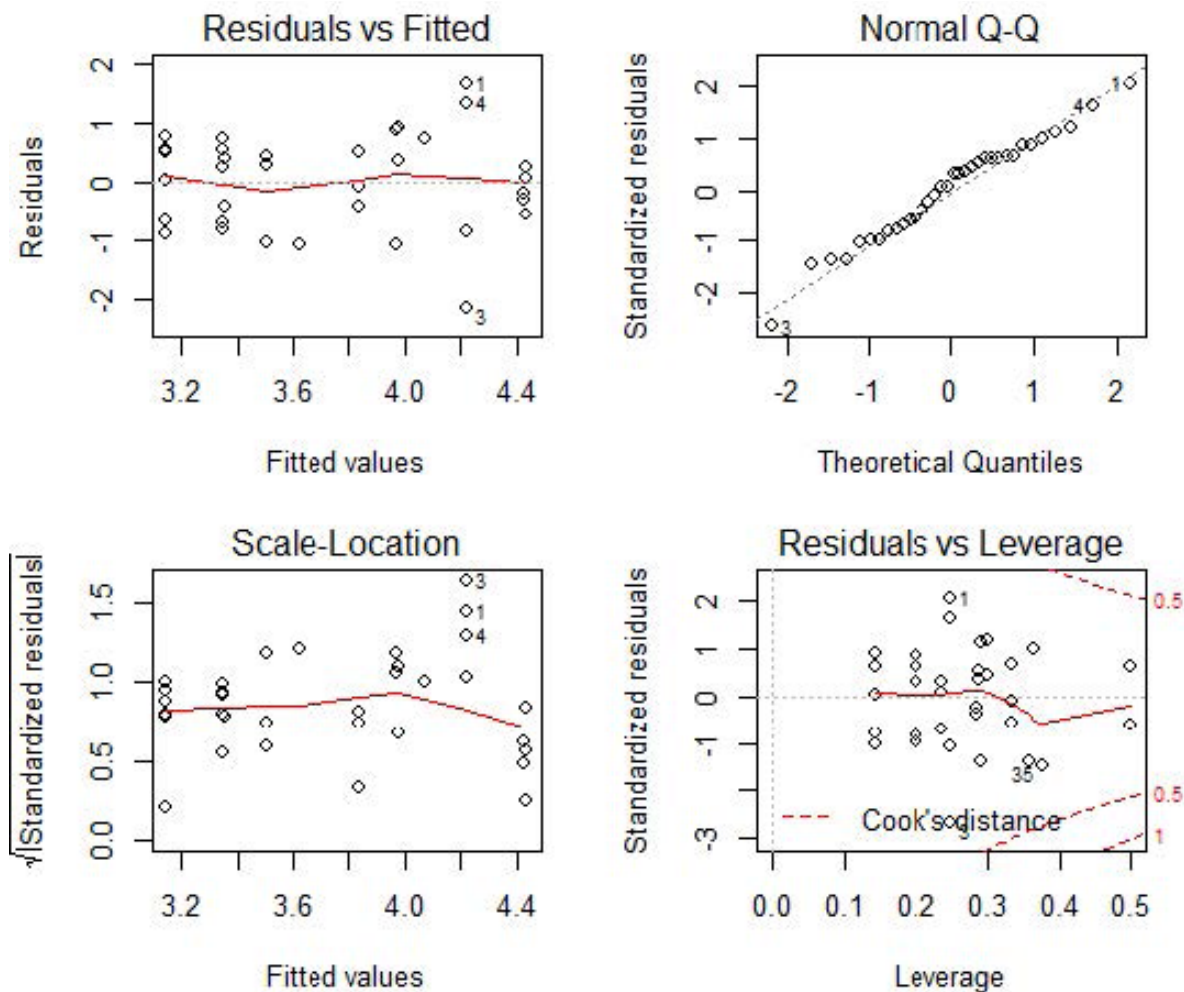
Condições de aplicabilidade do ANOVA

Boxplots



Não se verificam desvios importantes à normalidade, se bem que o ano 2008 não apresentou “bigodes”.

Análise de resíduos



Pelas mesmas razões expostas para a variável anterior, confirmam-se as condições de aplicabilidade da ANOVA, se bem que haja alguns resíduos ligeiramente desviados a nível do valor ajustado 4,2.

Variável Enterococos

Analysis of Variance Table

Response: log10(ENTEROC)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
ANO	3	10.903	3.6343	5.6176	0.0022442	**
LOCALIDADE	5	17.332	3.4663	5.3580	0.0005606	***
Residuals	47	30.406	0.6469			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Existem diferenças significativas tanto para o factor ano ($p < 0.01$) como para o factor localidade ($p < 0.001$).

ANO, means

	log10.ENTEROC.	std.err	r	Min.	Max.
2007	4.065398	0.3366201	10	2.740363	6.301030
2008	4.846532	0.3357861	7	3.653213	6.096910
2009	4.103572	0.1974100	21	2.857332	6.290035
2010	5.021033	0.2317627	18	3.748188	6.937016

Groups, Treatments and means

a	2010	5.021
ab	2008	4.847
b	2009	4.104
b	2007	4.065

Médias do mesmo grupo ou com o mesmo superíndice não diferem significativamente ($p < 0.05$).

LOCALIDADE, means

	log10.ENTEROC.	std.err	r	Min.	Max.
Chibia	4.690401	0.2758682	12	2.778151	6.096910
Huila	5.829491	0.4501573	3	4.973128	6.498311
Humpata	5.450347	0.3876692	9	3.531479	6.937016
Mulondo	4.167062	0.4805615	4	2.740363	4.740363
Rio-Areia	3.850584	0.1050336	13	3.255273	4.397940
Toco	4.105404	0.2176932	15	2.857332	5.889302

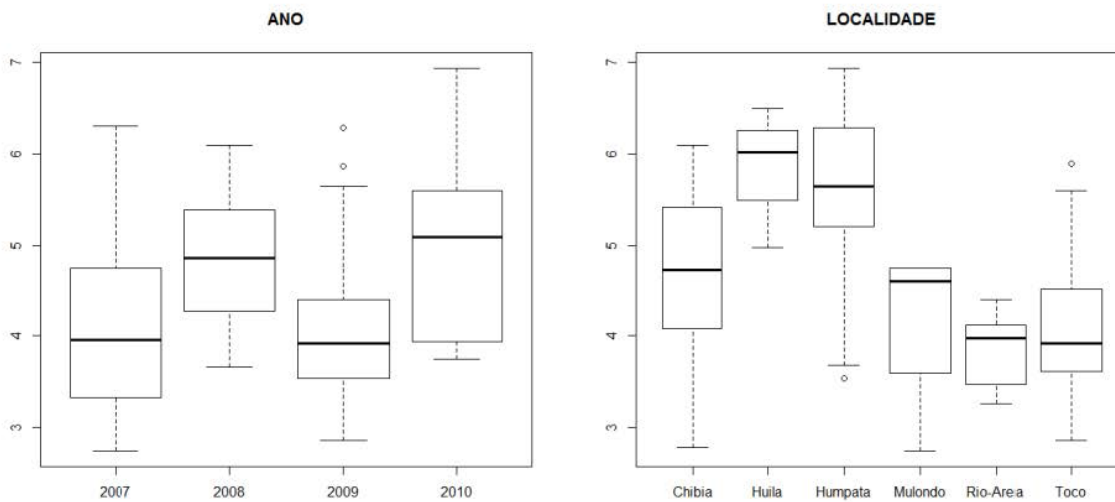
Groups, Treatments and means

a	Huila	5.829
a	Humpata	5.45
ab	Chibia	4.69
ab	Mulondo	4.167
b	Toco	4.105
b	Rio-Areia	3.851

Médias do mesmo grupo ou com o mesmo superíndice não diferem significativamente ($p < 0.05$).

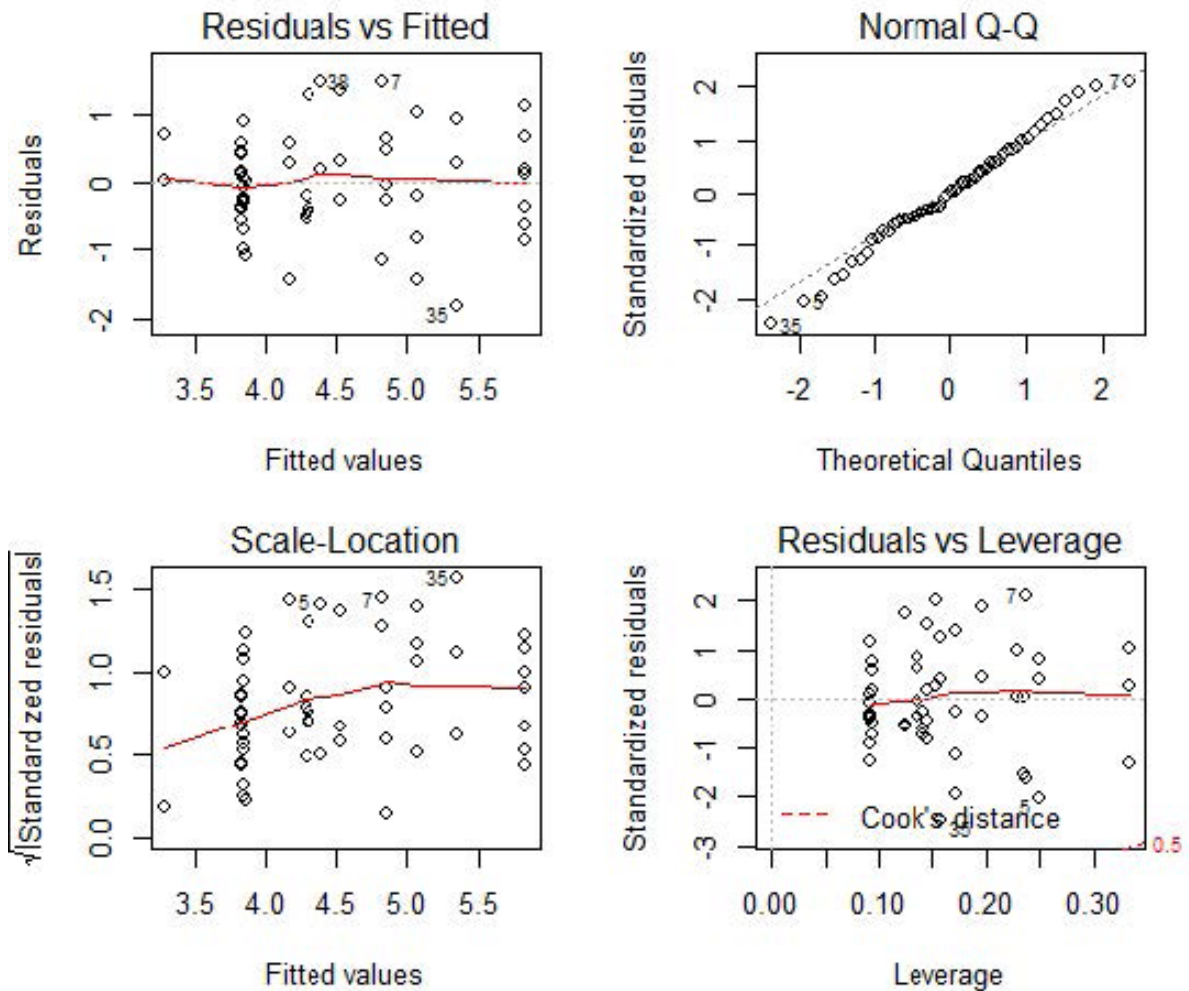
Condições de aplicabilidade do ANOVA

Boxplots



Não se verificam desvios importantes à normalidade, se bem que Mulondo não apresenta um dos “bigodes”.

Análise de resíduos



Pelas mesmas razões expostas para as variáveis anteriores, confirmam-se as condições de aplicabilidade da ANOVA.

Variável Enterobacteriaceae

Analysis of Variance Table

Response: log₁₀(ENTEROB)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ANO	2	9.8457	4.9228	7.2190	0.004988 **
LOCALIDADE	3	0.6108	0.2036	0.2985	0.825983
Residuals	18	12.2747	0.6819		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Há diferenças significativas entre os anos mas não entre localidades ($p < 0.01$)

	log10.ENTEROB.	std.err	r	Min.	Max.
2008	2.690357	0.2598388	5	1.954243	3.437751
2009	2.913122	0.1422505	14	2.146128	3.676694
2010	4.416916	0.6265904	5	3.276462	6.763428

Groups, Treatments and means

a	2010	4.417
b	2009	2.913
b	2008	2.69

Há diferenças significativas entre 2010 e os anos 2008 e 2009.

LOCALIDADE, means

	log10.ENTEROB.	std.err	r	Min.	Max.
Chibia	3.186741	0.4042246	5	2.278754	4.623249
Huila	4.601106	1.0902617	3	3.276462	6.763428
Rio-Areia	3.080920	0.1791242	9	2.301030	3.658011
Toco	2.693538	0.2297660	7	1.954243	3.676694

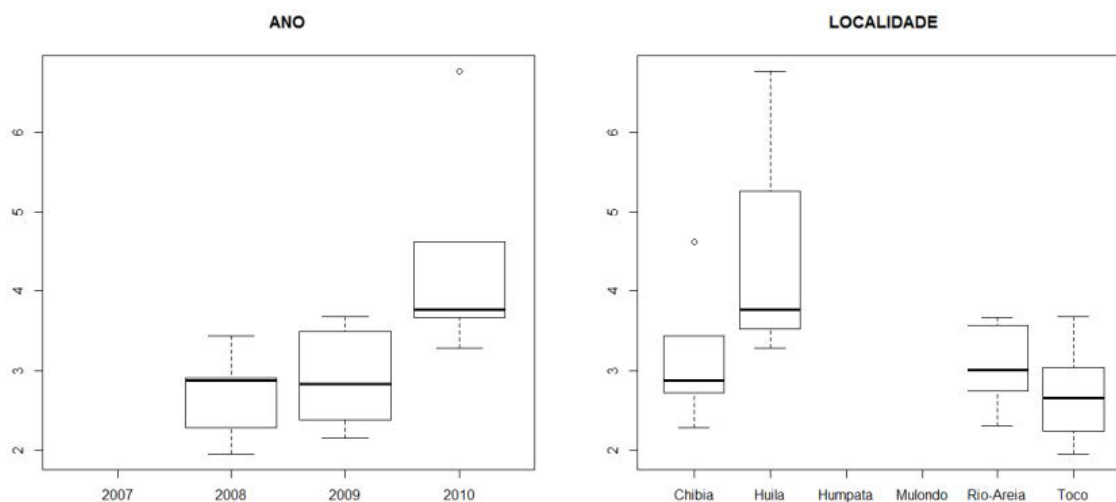
Groups, Treatments and means

a	Huila	4.601
ab	Chibia	3.187
ab	Rio-Areia	3.081
b	Toco	2.694

Este resultado é contraditório com o significado global da ANOVA.

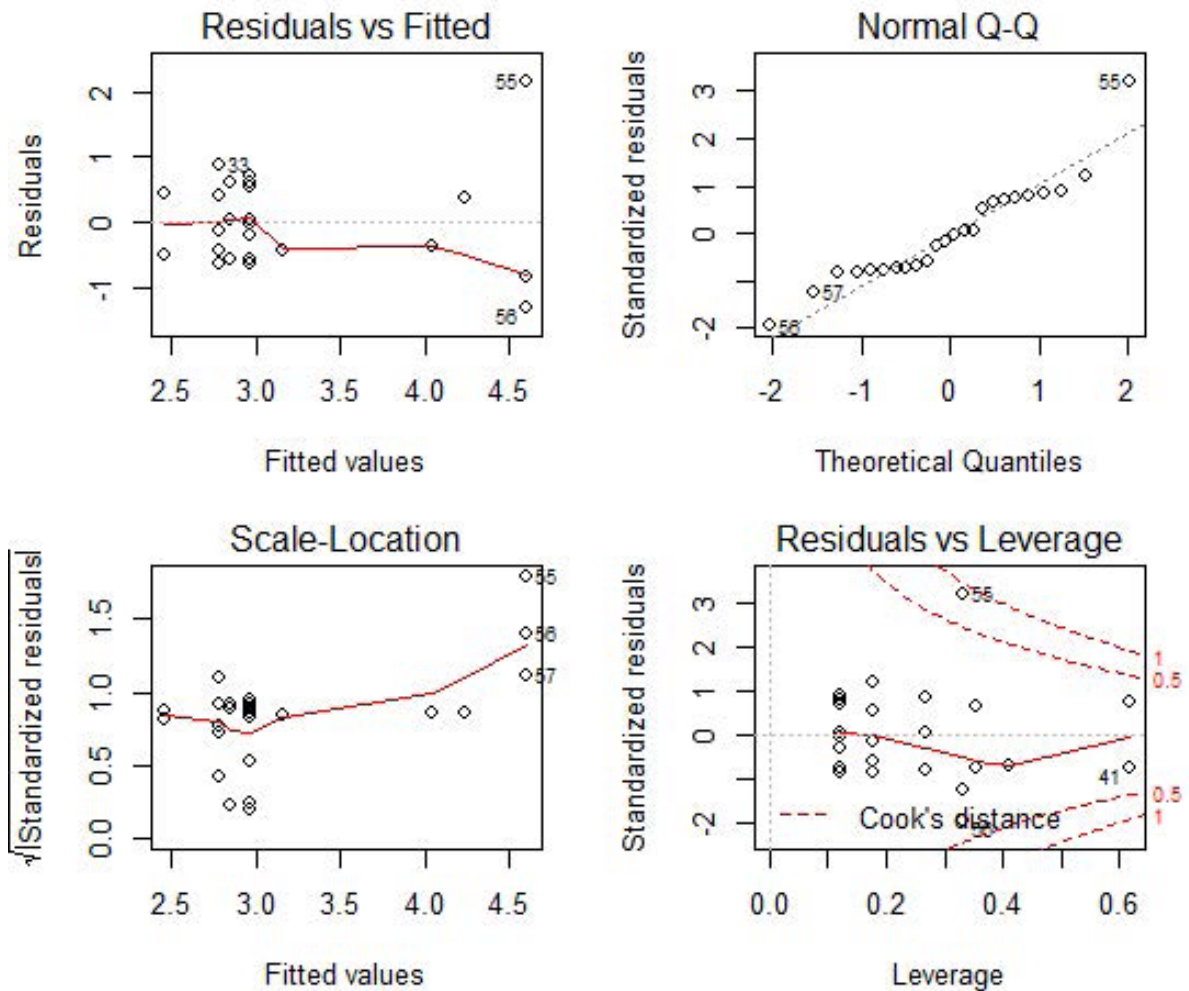
Condições de aplicabilidade da ANOVA

Boxplots



Verifica-se a falta do “bigode” em 2010 e na Chibia. O que faz supor um certo desvio à normalidade.

Análise de resíduos



Neste caso observa-se que alguns resíduos são maiores nas observações ajustadas do valor mais alto, o que supõe um desvio à suposta a homogeneidade de variâncias, mas são ligeiras. Os resíduos podem considerar-se normais, exceto uma observação. No conjunto não há as condições de aplicabilidade ótimas, mas, dada a robustez do ANOVA, podemos considerar os resultados válidos.

Variável Aeróbios Totais A 30°C

Analysis of Variance Table

Response: log10 (MTOTAIS)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
ANO	2	1.7342	0.8671	2.3420	0.1099
LOCALIDADE	4	12.8404	3.2101	8.6704	4.484e-05 ***
Residuals	38	14.0690	0.3702		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Factor localidade significativo ($p < 0.001$).

ANO, means

	log10.MTOTAIS.	std.err	r	Min.	Max.
2008	6.787582	0.3154717	6	6.100371	7.792392
2009	6.289618	0.1778450	21	5.000000	8.008600
2010	6.169134	0.1864668	18	5.153815	7.728354

Groups, Treatments and means

a	2008	6.788
a	2009	6.29
a	2010	6.169

LOCALIDADE, means

	log10.MTOTAIS.	std.err	r	Min.	Max.
Chibia	6.461130	0.2857269	10	5.153815	7.792392
Huila	6.342123	0.5716021	3	5.342423	7.322219
Humpata	7.312876	0.1871103	7	6.792392	8.008600
Rio-Areia	6.128182	0.1868924	11	5.437751	7.146128
Toco	5.829577	0.1316936	14	5.000000	7.079181

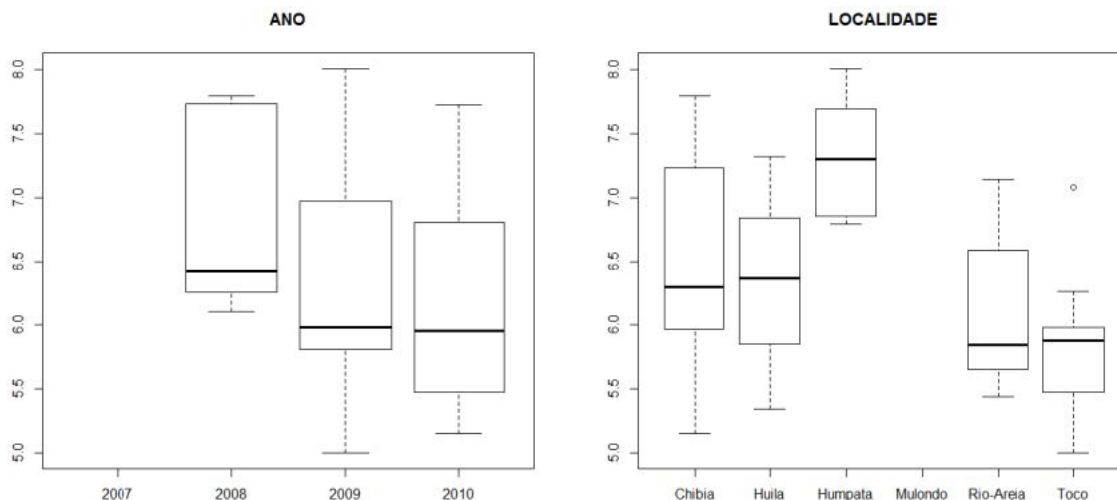
Groups, Treatments and means

a	Humpata	7.313
ab	Chibia	6.461
ab	Huila	6.342
b	Rio-Areia	6.128
b	Toco	5.83

Médias do mesmo grupo ou o mesmo superíndice não diferem significativamente para ($p < 0.05$).

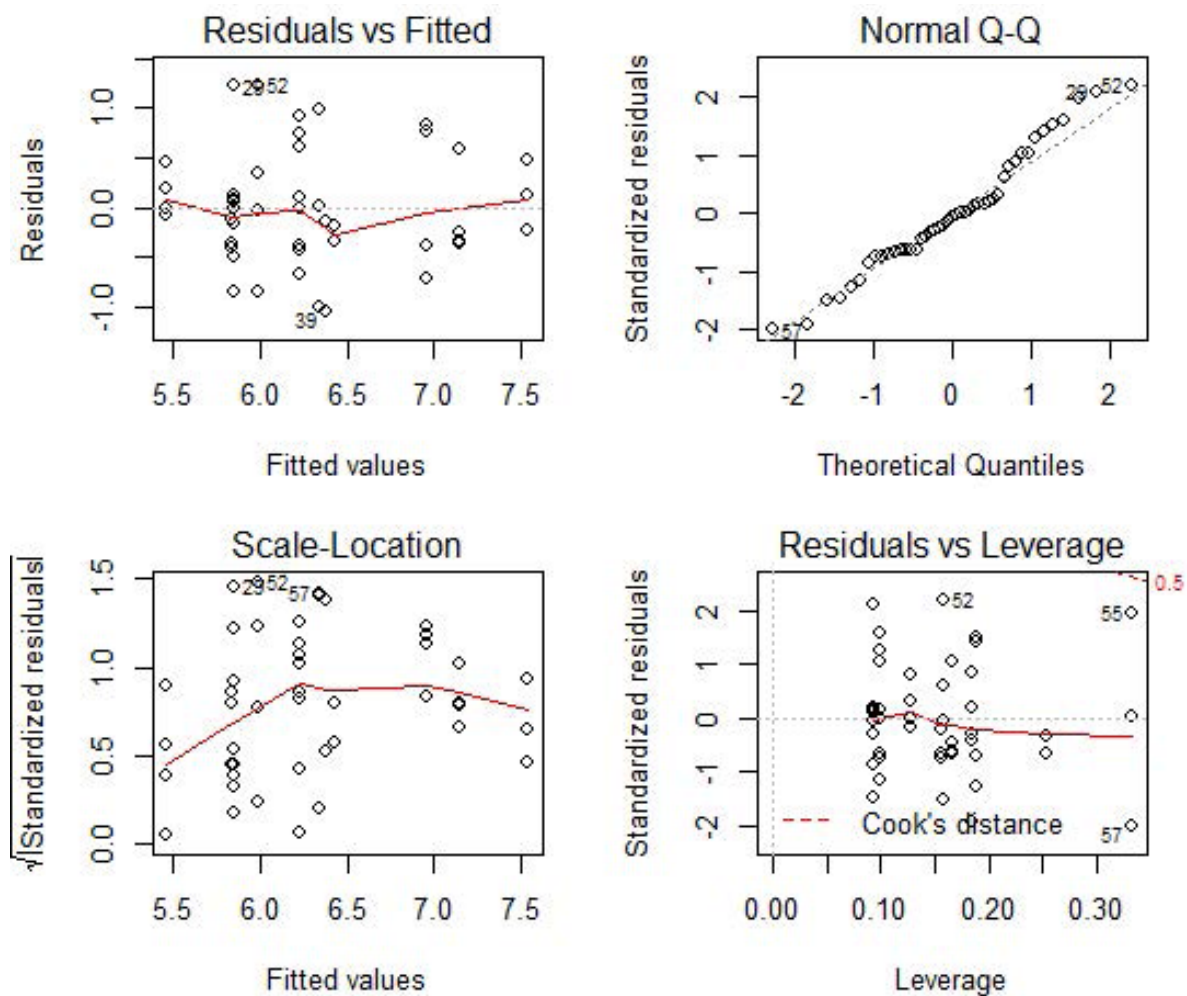
Condições de aplicabilidade do ANOVA

Boxplots



Não se verificam desvios importantes à normalidade.

Análise de resíduos



Em geral não há sinais evidentes de heterogeneidade de variâncias nem tão pouco de distribuição anormal dos resíduos. Cumprem-se as condições de aplicabilidade.

Anexo 2

Amostras de *omavele* obtidas na localidade do Toco em 2009 e 2010.

Amostras	Meio	Colônia	Identificação segundo a semelhança da sequência.		% de semelhança
			Grupo taxonómico ¹		
5	RGSA	1	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>		99
	M17	4	-		
	RB	5	<i>Kazachstania unispora</i>		99
	KAA	2	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>		99
6	RGSA	2	-		
	M17		-		
	RB	5	<i>Issatchenkia orientalis</i>		100
7	RGSA	2	<i>Lb. casei /Lb. paracasei</i>		99
	M17	1	-		
	RB	5	<i>Issatchenkia orientalis</i>		100
	KAA	2	<i>Lb. plantarum</i>		100
13	RGSA	-			
	RB	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		99
	KAA	1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		99
14	RGSA				
	RB	5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		99
	KAA	1			
15	RGSA	1	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>		99
	M17	5	-		
	RB	4	<i>Kazachstania unispora</i>		98
	KAA	1	<i>Lb. helveticus/Lb. plantarum</i>		100
16	RGSA	4	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>		100
	M17	2	-		
	RB	2	<i>Kazachstania unispora</i>		99
	KAA	4	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>		99
4	RGSA	1	-		
	M17	1	-		
	RB	1	<i>Kazachstania unispora</i>		99
	KAA	3	<i>Enterococcus faecalis</i>		99
5	RGSA	1	-		
	M17	1	-		
	RB	3	<i>Kazachstania unispora</i>		98
	KAA	1	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>		99
6	RGSA	1	-		
	M17	1	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>		100
	RB	1	<i>Kazachstania unispora</i>		99
	KAA	1	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>		99
7	RGSA	1	-		
	M17	1	-		
	RB	1	<i>Kazachstania unispora</i>		99
	KAA	1	<i>Lb. casei</i>		93

1 - Géneros ou espécies que apresentam maior semelhança com as sequências de DNA obtidas.

Amostras de *omavele* obtidas na localidade da Chibia em 2007, 2009 e 2010.

Amostras	Meio	Colônia	Identificação segundo a semelhança da sequência. Grupo taxonômico ¹	% de semelhança
11	RGSA		<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	
	M17		<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	
	RB		<i>Kazachstania unispora</i>	
	KAA		<i>Lb. casei/Lb. paracasei</i>	
12	RGSA		<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	
	M17		<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	
	RB		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
20	RGSA	2	-	
	M17	4	-	
	RB	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
	KAA	3	<i>Weissella confusa/Weissella sp.</i>	99
21	RGSA	5	<i>Lb. casei/Lb. paracasei</i>	100
	M17	1	-	
	RB	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
	KAA	2	<i>Lactococcus lactis</i>	100
9	RGSA	1	<i>Lb. casei/Lb. paracasei</i>	99
	M17	3	<i>Lb. casei/Lb. paracasei</i>	99
	RB	1	<i>Kluyveromyces marxianus/Kluyveromyces lactis</i>	100
	KAA	1	<i>Lb. plantarum</i>	100
10	RGSA	1	<i>Latococcus lactis</i>	99
	M17	1	<i>Latococcus lactis</i>	100
	RB	1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100
	KAA	1	<i>Enterococcus faecalis/Enterococcus sp.</i>	96
14	RGSA	1	-	
	M17	1	<i>Lb. casei/Lb. casei</i>	100
	RB	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
	KAA	1	<i>Lb. plantarum</i>	100
16	RGSA	1	-	
	M17	1	<i>Lb. casei/Lb. casei</i>	99
	RB	1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100
	KAA	1	<i>Lb. casei/Lb. casei</i>	99

1 - Gêneros ou espécies que apresentam maior semelhança com as sequências de DNA obtidas.

Amostras de *omavele* obtidas na localidade da Humpata em 2007, 2009 e 2010.

Amostras	Meio	Colónia	Identificação segundo a semelhança da sequência.	
			Grupo taxonómico ¹	% de semelhança
7	RGSA		<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	
	M17		<i>Enterococcus durans/Enterococcus hirae</i>	
	RB		<i>Issatchenkia orientalis</i>	
	KAA		<i>Lb. rhamnosus</i>	
8	RGSA		<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	
	M17		<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	
	RB		<i>Kazachstania unispora/Saccharomyces unisporus</i>	
	KAA		<i>Lb. casei/Lb. paracasei</i>	
17	RGSA	2	<i>Lb. helveticus</i>	99
	M17	5		
	RB		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99
	KAA			
18	RGSA	5		
	M17	2	<i>Lactococcus lactis</i>	99
	RB	3		
	KAA	1	<i>Enterococcus durans</i>	99
19	RGSA	5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100
	M17	5		
	RB	4	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100
	KAA	1	<i>Enterococcus durans</i>	98
8	RGSA	1		
	M17	1		
	RB	1	<i>Kazachstania unispora</i>	99
	KAA	1	<i>E. durans/Enterococcus sp.</i>	99
11	RGSA	1	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	
	M17	1		
	RB	1	<i>Kazachstania unispora</i>	100
	KAA	1	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	99
12	RGSA	1		
	M17	1		
	RB	1	<i>Kazachstania unispora</i>	100
	KAA	1	<i>E. durans/Enterococcus sp.</i>	99
15	RGSA	1		
	M17	1		
	RB	1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100
	KAA	1	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	99

1 - Géneros ou espécies que apresentam maior semelhança com as sequências de DNA obtidas.

Amostras de *omavele* obtidas na localidade de Mulondo em 2007.

Amostras	Meio	Identificação segundo a semelhança da sequência.
		Grupo taxonómico ¹
1	RGSA	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	M17	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	RB	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2	RGSA	
	M17	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	RB	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	KAA	
3	RGSA	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	M17	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	RB	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	KAA	<i>Lb. rhamnosus</i>
4	RGSA	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	M17	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	RB	<i>Issatchenkia orientalis</i>
	KAA	<i>Enterococcus durans/Enterococcus hirae</i>
5	RGSA	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	M17	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	RB	<i>Kazchastania unispora/Saccharomyces unisporus</i>
	KAA	
6	RGSA	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	M17	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>
	RB	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	KAA	<i>Enterococcus durans/ Enterococcus hirae</i>

1 - Géneros ou espécies que apresentam maior semelhança com as sequências de DNA obtidas.

Amostras de *omavele* obtidas na localidade da Huíla em 2010.

Amostras	Meio	Colónia	Identificação segundo a semelhança da	% de
			seqüência. Grupo taxonómico ¹	
13	RGSA	1	<i>Lb. helveticus</i>	99
	M17	1	<i>Lb.plantarum/Lb. pentosus</i>	99
	RB	1		
	KAA	1	<i>Lb. casei/Lb. paracasei</i>	99
17	RGSA	2	<i>Lb.plantarum/Lb. pentosus</i>	99
	M17	1		
	RB	1	<i>Kazachstania unispora</i>	99
	KAA	1		
18	RGSA	1	<i>Lb.plantarum/Lb. pentosus</i>	
	M17	1		
	RB	1	<i>Trichosporum coremiiforme/Trichosporon sp.</i>	99
	KAA	1	<i>Enterococcus durans/Enterococcus sp.</i>	99
19	RGSA	1		
	M17	1	<i>Enterococcus durans/Enterococcus sp.</i>	
	RB	1	<i>Kazachstania unispora</i>	
	KAA	1	<i>Enterococcus durans/Enterococcus sp.</i>	
20	RGSA	1	<i>Lb.plantarum/Lb. pentosus</i>	99
	M17	1	<i>Lb.plantarum/Lb. pentosus</i>	99
	RB	1	<i>Kazachstania unispora</i>	95
	KAA	1	<i>Lb.plantarum/Lb. pentosus</i>	99
21	RGSA	1		
	M17	1		
	RB	1	<i>Kluyveromyces marxianus/Kluyveromyces lactis</i>	99
	KAA	1	<i>Enterococcus durans/Enterococcus sp.</i>	99

1 - Géneros ou espécies que apresentam maior semelhança com as seqüências de DNA obtidas.

Amostras de *omavele* obtidas na localidade Rio Areia da em 2007, 2009 e 2010.

Amostras	Meio	Colônia	Identificação segundo a semelhança da	% de
			sequência. Grupo taxonômico ¹	
9	RGSA	-	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	-
	M17	-	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	-
	RB	-	<i>Kluyveromyces marxianus/Kluyveromyces lactis</i>	-
	KAA	-	<i>Pediococcus pentasaceus</i>	-
10	RGSA	-	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	-
	M17	-	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	-
	RB	-	-	-
	KAA	--	-	-
1	RGSA	1	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	99
	M17	5	-	-
	RB	1	<i>Pichia deserticola/Candida ethanolica</i>	97
2	RGSA	4	<i>Lb. plantarum</i>	99
	M17	3	-	-
	RB	1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100
	KAA	1	-	-
3	RGSA	2	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	99
	M17	1	-	-
	RB	2	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	95
	KAA	2	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	99
4	RGSA	2	<i>Lb. plantarum</i>	99
	M17	4	-	-
	RB	1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100
	KAA	3	<i>Enterococcus durans</i>	99
9	RGSA	4	-	-
	M17	4	-	-
	RB	5	<i>Kazachstania unispora</i>	99
	KAA	-	<i>Lb. plantarum</i>	99
10	RGSA	1	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	99
	M17	4	-	-
	RB	4	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	99
	KAA	1	-	-
11	RGSA	5	<i>Lb. plantarum/Lb. pentosus</i>	99
	M17	5	-	-
	RB	1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100
	KAA	4	<i>Lb. helveticus/Lb. pentosus</i>	100
12	RGSA	1	-	-
	M17	4	-	-
	RB	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
1	RGSA	2	<i>Enterococcus durans</i>	99
	M17	3	-	-
	RB	1	<i>Lactococcus lactis</i>	99
	KAA	1	<i>Issatchenkia orientalis</i>	100
2	RGSA	1	-	-
	M17	1	-	-
	RB	1	<i>Kazachstania exigua/ Kazachstania turicensis</i>	98
	KAA	2	-	-
3	RGSA	1	-	-
	M17	1	-	-
	RB	1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99
	KAA	1	-	-

1 - Gêneros ou espécies que apresentam maior semelhança com as sequências de DNA obtidas.

Anexo 3

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

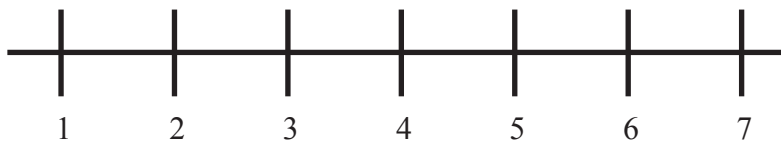
DATA AMOSTRA Nº

Provar as amostras e atribuir a classificação de 1 a 7 (de menor a maior intensidade) a cada atributo.

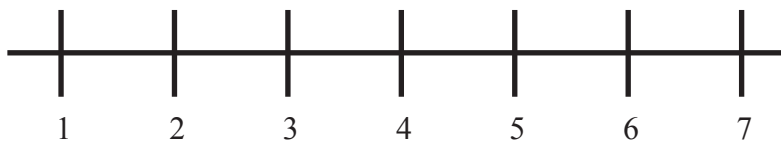
Caso tenha algum comentário importante a fazer deverá anotá-lo na caixa de observações.

CHEIRO

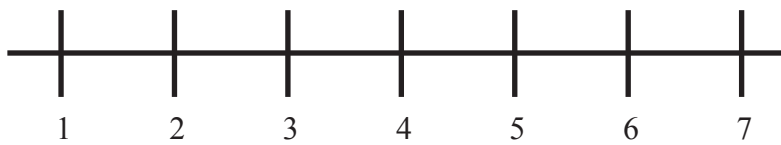
Lácteo



Leveduras

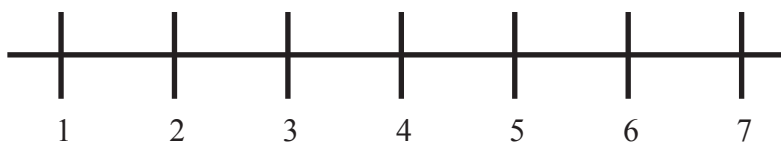


Outros

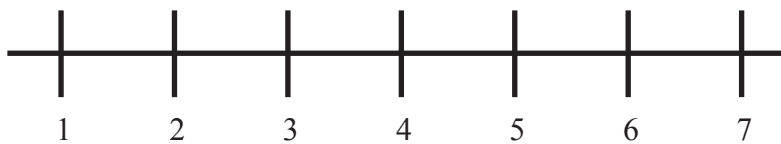


SABOR

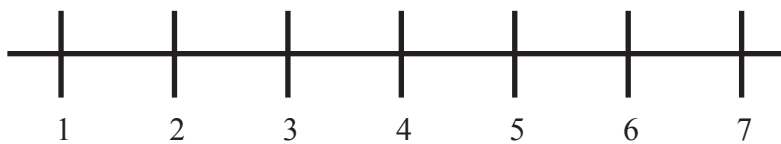
Ácido



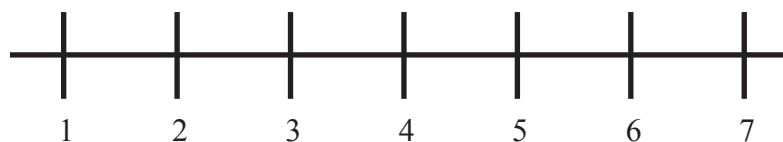
Amargo



Acético/vinagre

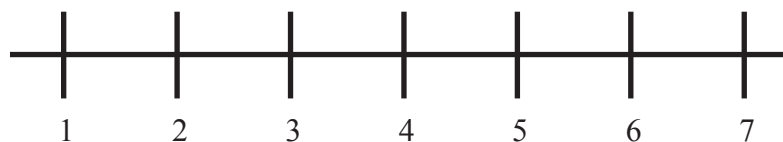


Outros



TEXTURA

Granulada



Fina



O que te faz recordar o cheiro e o sabor?

Qual é a amostra que mais te agrada?

Observações

OMAVELE 1

Provedores	CHEIRO			SABOR				TEXTURA	
	Lácteo	Levadura	Outros	Ácido	Amargo	Acético/ vinagre	Outros	Granulada	Fina
1	6	3	1	2	4	2		1	6
2	6	3	1	2	3	2		1	5
3	5	3		4	2	2		2	7
4	3	7		5	1	1		1	6
5	3	6		1	3	1		1	7
6	6	3		4		1		1	6
7	4			2					7
8	5	3	3	4	2	5		5	2
9	2	5	7	2	1	2	5	1	6
10	4	2	4	2	1	1		2	5
11	6	2		1	1			1	6
Media	4,5	3,7	3,2	2,6	2,0	1,9	5,0	1,6	5,7
SD	1,4	1,7	2,5	1,4	1,1	1,3		1,3	1,4

OMAVELE 2

Provedores	CHEIRO			SABOR				TEXTURA	
	Lácteo	Levadura	Outros	Ácido	Amargo	Acético/ vinagre	Outros	Granulada	Fina
1	5	4		5	3	3		6	3
2	3	6	4	6	7	5		3	4
3	2	6	4	6	3	6		4	5
4	2	7		6	3	5		5	2
5	3	6		6	4	5		6	1
6	4	6		5		3		6	
7	6	5		5				4	
8	6	5	5	6	3	7		7	1
9	2	3	2	6	3	3	4	6	2
10	3	4	3	4	3	2		6	2
11	1	6	5	4	6	6	4	6	1
Media	3,4	5,3	3,8	5,4	3,9	4,5	4,0	5,4	2,3
SD	1,7	1,2	1,2	0,8	1,5	1,6	0,0	1,2	1,4

OMAVELE 3

Provadores	CHEIRO			SABOR				TEXTURA	
	Lácteo	Levadura	Outros	Ácido	Amargo	Acético/ vinagre	Outros	Granulada	Fina
1	3	6		6	5	3		2	5
2	4	4	2	6	6	5		3	4
3	3	7		7	6	7		5	3
4	2	4		2	1	1		1	7
5	5	7		6	4	6		5	2
6	4	7		7		4		5	
7	7	6		7	2			4	
8	2	4	4	5	3	5		6	1
9	1	4	5	7	2	4	6	5	3
10	5	3	1	5	5	3		4	3
11	1	6	4	4	5	6		5	2
Media	3,4	5,3	3,2	5,6	3,9	4,4	6,0	4,1	3,3
SD	1,9	1,5	1,6	1,6	1,8	1,8		1,5	1,8

APRECIÇÃO DOS PROVADORES

Provadores	Semelhança do cheiro e do sabor	Amostra preferida	Observações
1	iogurte	O2	O2 - mais equilibrada
2	queijo	O3	O3 - mais gosto a láctico
3	O1= kefir; O2= roquefort ou queijo maduro; O3= cerveja	O1	O1- mais suave e mais parecido ao leite fermentado
4	O1= pão	O1 pelo sabor/O3 pela textura	O1- textura aguada na boca; O3 mais viscoso ou espesso; O2 demasiado gosto a levedura e vinagre
5	iogurte ácido	O3	
6		O2	O1 sabor estranho
7	iogurte liquido	O2	
8	O1= queijo; O2= vinagre; O3= indefinido	O1	
9	iogurte natural	O2	O1=leite; O3=muito ácida; O2 mais densa agradaria mais ao paladar
10	iogurte, alcóois, doce (O1)	O1	combinar e adocicar O2 e O3
11	fermentos (O1=iogurte; O2 e O3=acético)	O1	O1 mais parecido ao iogurte

Amostra preferida

5 provadores - O1

4 provadores -O2

2 provadores - O3