



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

ESTG

Avaliação do potencial biotecnológico de estirpes selvagens de *Weissella cibaria* para a indústria alimentar Victor Joaquim Pereira Monteiro

2026



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Avaliação do potencial biotecnológico de estirpes selvagens de *Weissella cibaria* para a indústria alimentar

Victor Joaquim Pereira Monteiro

Escola Superior de Tecnologia e Gestão



INSTITUTO POLITÉCNICO
DE VIANA DO CASTELO

Victor Joaquim Pereira Monteiro

Avaliação do potencial biotecnológico de estirpes selvagens de
Weissella cibaria para a indústria alimentar

Mestrado em Engenharia Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do
Professor Doutor Paulo Alexandre da Costa Fernandes

Julho de 2026

MEMBROS DO JÚRI

Presidente:

Professora Doutora Rita Isabel Couto Pinheiro

Vogal:

Professora Doutora Helena da Conceição Pereira Albano

Vogal/Orientador:

Professor Doutor Paulo Alexandre da Costa Fernandes

DEDICATÓRIA

*À minha mãe
À minha mulher
Aos meus filhos.*

AGRADECIMENTOS

Ao *Instituto Politécnico de Viana do Castelo*, através das diferentes direções da *Escola Superior de Tecnologia e Gestão*, expresso o meu profundo agradecimento pelo apoio concedido ao longo destes 5 anos entre Licenciatura e Mestrado em Engenharia Alimentar. Apreciei o seu papel na conciliação entre as minhas responsabilidades profissionais e académicas. Esta compreensão e colaboração foram determinantes para a concretização deste percurso académico.

Ao Professor Doutor Paulo Alexandre da Costa Fernandes, meu orientador, agradeço sinceramente todo o apoio e orientação ao longo deste projeto. A sua disponibilidade, clareza e incentivo foram essenciais para o ter levado a termo com sucesso. Agradeço também a amizade e cooperação demonstradas ao longo dos meus 20 anos nesta instituição, que marcaram de forma positiva o meu percurso tanto académico como profissional.

À Dra. Lígia Ramos Fernandes, a minha sincera gratidão. Eu sei que já lá vão mais de 20 anos, mas nunca esqueci que, na véspera do meu 31.º aniversário, a sua dedicação, perseverança e empenho foram fundamentais para que eu pudesse assinar o meu contrato de Estágio Profissional com o IPVC em vésperas de caducar o prazo legal. Esse gesto, aparentemente anódino, foi determinante para que anos mais tarde, eu viesse a integrar os quadros do IPVC e adquirisse a estabilidade profissional necessária para querer ir mais longe.

À Doutora Élia Fernandes, pelo seu apoio e na partilha de conhecimentos.

Aos meus colegas e professores com quem caminhei ao longo deste percurso académico.

À minha família, em especial à minha esposa e aos meus filhos, agradeço pelo incentivo constante, pela paciência em todos os momentos e pela compreensão nas muitas férias que ficaram por fazer. O vosso apoio foi essencial ao longo deste percurso.

À minha mãe, um agradecimento muito especial por nunca ter desistido de acreditar que eu podia ir mais longe, mesmo depois dos 50 anos. O seu exemplo e a sua força foram sempre uma inspiração.

RESUMO

As estirpes da espécie *Weissella cibaria* são candidatas promissoras para a descoberta de novos compostos de interesse biotecnológico para a indústria ou para aplicações probióticas. No presente estudo, avaliou-se o potencial biotecnológico e o perfil de segurança microbiológica de sete estirpes selvagens pertencentes à coleção da Unidade de Microbiologia Aplicada da Escola Superior de Tecnologia e Gestão da Universidade Politécnica de Viana do Castelo (ESTG-UNIPVC). As estirpes demonstraram uma atividade antimicrobiana assinalável contra agentes patogénicos selecionados, atuando através de um mecanismo dependente da presença de células, sem evidência de secreção de bacteriocinas para o meio de cultura. Relativamente aos atributos probióticos funcionais, todas as estirpes exibiram elevada tolerância aos sais biliares, a concentrações moderadas de sal (até 7%) bem como uma capacidade significativa de remoção de colesterol *in vitro*. Os ensaios de adesão celular revelaram uma coagregação robusta com espécies indicadoras e patogénicas (*Escherichia coli* e *Salmonella enterica*), o que sugere um mecanismo eficaz de exclusão competitiva e capacidade de estabelecimento em biofilmes protetores. A caracterização da segurança microbiológica incluiu o rastreio de atividades enzimáticas potencialmente indesejáveis (gelatinase, lipase, DNase e atividade hemolítica) e a determinação da produção de aminas biogénicas; estes atributos foram nulos ou insignificantes, reforçando o estatuto de segurança das estirpes. Adicionalmente, seis das sete estirpes produziram quantidades substanciais de exopolissacarídeos (EPS), presumivelmente identificados como dextrano, com atividade antioxidante. Entre as estirpes analisadas, a *W. cibaria* PFM1679 destacou-se por reunir, de forma integrada, eficácia antimicrobiana, elevadas propriedades de adesão, produção proeminente de EPS e segurança microbiológica, emergindo como a candidata mais promissora para a biossíntese de compostos com potencial tecnológico e/ou incorporação em formulações alimentares probióticas e subsequente validação *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVE: *Weissella cibaria*; LAB; Bacteriocinas; EPS; Antioxidantes; Probióticos; GRAS

ABSTRACT

Strains of the species *Weissella cibaria* represent promising candidates for the discovery of new compounds of biotechnological interest to industry or for probiotic applications in functional foods. In the present study, the biotechnological potential and microbiological safety profile of seven wild strains from the collection of the Applied Microbiology Unit at the School of Technology and Management of the Polytechnic University of Viana do Castelo (ESTG-UNIPVC) were evaluated. The strains demonstrated remarkable antimicrobial activity against selected pathogens, acting via a cell-dependent mechanism, with no evidence of bacteriocin secretion into the culture medium. With regard to functional probiotic attributes, all strains exhibited high tolerance to bile salts, as well as a significant capacity for cholesterol removal *in vitro*. Cell adhesion assays revealed robust co-aggregation with indicator and pathogenic species (*Escherichia coli* and *Salmonella enterica*), suggesting an effective mechanism of competitive exclusion and the ability to establish themselves in protective biofilms. The microbiological safety characterization included *screening* for potentially undesirable enzymatic activities (gelatinase, lipase, DNase and haemolytic activity) and the determination of biogenic amine production; these attributes were absent or negligible, reinforcing the safety status of the strains. In addition, six of the seven strains produced substantial quantities of exopolysaccharides (EPS), presumably identified as a dextran, with antioxidant activity. Among the strains analyzed, *W. cibaria* PFM1679 stood out for its integrated combination of antimicrobial efficacy, high adhesion properties, prominent EPS production and confirmed microbiological safety, emerging as the most promising candidate for the biosynthesis of compounds with technological potential and/or incorporation into probiotic food formulations and subsequent *in vivo* validation.

KEYWORDS: *Weissella cibaria*; LAB; Bacteriocins; EPS; Antioxidants; Probiotic; GRAS

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

ABTS - Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina - sulfonato)
AN - Agar Nutritivo, Agar Nutritivo
ATP - Adenosine TriPhosphate
BHI - Brain Heart Infusion
CLA - Conjugated Linoleic Acid, Conjugated Linoleic Acids
Da - Dalton
DNA - Acido Desoxirribonucleico
DO - Densidade Ótica
DOP - Denominação de Origem Protegida
DPPH - diphenyl-1-picrylhydrazine
EFSA - European Food Safety Authority, European Food Safety Authority
EPS - Exopolissacarídeo
ESTG-IPVC - Escola Superior de Tecnologia e Gestão - Instituto Politécnico de Viana do Castelo
FDA - Food and Drug Administration
GAE - Galic Acid Equivalent
GRAS - Generally Recognized as Safe
HAT- Hydrogen Atom Transfer
HCl - Cloreto de Hidrogénio - Ácido Clorídrico
HePS - Heteropolissacarídeos
HoPS - Homopolissacarídeos
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
LA - Linoleic Acid
LAB - Lactic Acid Bacteria
LDB - Lysin Descarboxilase Broth
MATH - Microbial Adhesion to Hydrocarbons
McF- Padrão Mc Farland
MH - Mueller Hinton Agar
MRSB/A - MAN, ROGOSA and SHARPE Broth/Agar
NADPH - reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH - Hidróxido de Sódio
ONU - Organização das Nações Unidas
PCR - Polymerase Chain Reaction
PTMs - Modificações pós-transducionais
QPS - Qualified Presumption of Safety
rDNA - Ribosomal Dexoxyribonucleic Acid
TE - Tampão EDTA
TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TPC - Total Phenolic Coumpounds
TSA - Tryptic Soy Agar
UA - Ureia Agar
UMA - Unidade de Microbiologia Aplicada
WMAG/WMBG - *Weissella* Medium Agar/Broth com Glucose 2%
WMA - *Weissella* Medium Agar
WMB - *Weissella* Medium Broth

ÍNDICE

ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS DO TRABALHO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1. NOVOS COMPOSTOS BIOTECNOLÓGICOS E DESAFIOS DA INDÚSTRIA ALIMENTAR	4
1.1. <i>Segurança Alimentar / Aumento do tempo de prateleira</i>	5
1.2. <i>Tendências de consumo</i>	5
1.3. <i>Proteínas alternativas</i>	6
1.4. <i>Metabolitos tecnofuncionais</i>	6
2. LIMITAÇÕES DOS MÉTODOS CLÁSSICOS NA IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE ESTIRPES DE INTERESSE TECNOLÓGICO	7
3. BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO (LAB)	9
3.1. <i>LAB produtoras de metabolitos</i>	10
3.1.1. Antimicrobianos	10
3.1.1.1. Atividade antimicrobiana	10
3.1.1.2. Outros antimicrobianos	14
3.1.2. Enzimas	15
3.1.3. Exopolissacarídeos (EPS)	16
3.1.4. Ácidos gordos	18
3.1.5. Vitaminas	19
3.1.6. Antioxidantes	20
3.2. <i>Weissella</i>	20
3.2.1. Género <i>Weissella</i>	20
3.2.2. <i>Weissella cibaria</i>	23
3.3. <i>Algumas possíveis aplicações de Weissella</i>	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
1. MICRORGANISMOS USADOS E REGENERAÇÃO DAS CÉLULAS	25
2. MEIOS DE CULTURA USADOS	26
3. CONDIÇÕES DE CULTURA USADAS	27
3.1. <i>Efeito da fonte de carbono e da temperatura, no crescimento</i>	27
3.2. <i>Efeito do pH no crescimento</i>	28
3.3. <i>Curva padrão de crescimento (DO vs UFC) e taxa de crescimento</i>	29
4. CARATERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS	30
5. CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FUNCIONAIS	32
5.1. <i>Ácido Linoleico Conjugado (CLA)</i>	32
5.2. <i>Produção de antioxidantes</i>	32
5.2.1. Preparação prévia das Amostras	32
5.2.2. Métodos de análise	33
5.3. <i>Produção de diacetilo</i>	35
5.4. <i>Atividade antimicrobiana</i>	36
5.5. <i>Produção de EPS</i>	37
5.5.1. <i>Screening</i> inicial	37
5.5.2. Produção de EPS	38
5.5.3. Efeito <i>quorum sensing</i> (QS)	39
5.5.4. Determinação da composição do EPS	40
6. PROPRIEDADES PROBIÓTICAS	42
6.1. <i>Testes de adesão celular</i>	42
6.1.1. Hidrofobicidade superficial das células	42
6.1.2. Ensaio de autoagregação e coagregação	43
6.2. <i>Testes de resistência aos sais biliares</i>	43
6.3. <i>Testes de segurança - Fatores de virulência</i>	44
6.3.1. <i>Teste da produção de enzimas hidrolíticas</i>	44
6.3.1.1. Gelatinase	44
6.3.1.2. Lipase/atividade lipolítica	44

6.3.1.3.	DNase (Desoxirribonuclease)	44
6.3.2.	Atividade hemolítica	44
6.3.3.	Aminas biogénicas:	45
6.4.	Capacidade de Remoção do colesterol	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO		46
1.	CARATERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	46
1.1.	Meios de cultura	46
1.2.	Fonte de carbono	47
1.3.	Temperatura	48
1.4.	pH e acidificação do meio	49
1.5.	Cinética de crescimento	50
2.	CARATERIZAÇÃO FENOTÍPICA	52
3.	PRODUÇÃO DE METABOLITOS DE INTERESSE TECNOLÓGICO	53
3.1.	CLA	53
3.2.	Diacetilo	53
3.3.	Bacteriocinas	54
3.4.	EPS	58
3.3.1.	Produção	58
3.3.2.	Determinação da composição do EPS	62
4.	POTENCIAL PROBIÓTICO E SEGURANÇA	64
4.1.	Fatores de virulência	64
4.2.	Resistência ao sal	65
4.3.	Atividade antioxidante	66
4.4.	Resistência aos sais biliares	68
4.5.	Remoção do colesterol	69
4.6.	Testes de adesão celular	70
4.6.1.	Hidrofobicidade superficial	70
4.6.2.	Autoagregação - Coagregação	71
4.6.2.1.	Autoagregação	71
4.6.2.2.	Coagregação:	72
CONCLUSÃO		74
BIBLIOGRAFIA		76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: PRINCIPAL UTILIZAÇÃO DAS ENZIMAS NA INDÚSTRIA (KUMAR A., 2024)	7
FIGURA 2: ARVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A PROXIMIDADE DE WEISSELLA COM OUTRAS LAB INSPIRADO DE (COLLINS MD, 1993)	9
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO MORFOLÓGICA CARACTERÍSTICA DO GRUPO LAB, BASTONETES (LACTOBACILLUS SPP.) E COCOS ORGANIZADOS EM CADEIAS (STREPTOCOCCUS SPP. OU LACTOCOCCUS SPP. FONTE: GERADO POR INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL (GEMINI, GOOGLE, 2026)	10
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DA NISINA - FONTE: GERADO POR INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL (GEMINI, GOOGLE, 2026)	11
FIGURA 5: CLASSIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS DE GRAM-POSITIVOS ADAPTADO POR SOLIS-BALANDRA (SOLIS-BALANDRA MA, 2024) DE SHARMA (SHARMA K., 2021))	11
FIGURA 6: ESQUEMA DA CLASSIFICAÇÃO DE BACTERIOCINAS DE GRAM-POSITIVOS (ADAPTADO POR (SOLIS-BALANDRA MA, 2024) DE (PÉREZ-RAMOS, MADI-MOUSSA, COUCHENEY, & DRIDER, 2021))	13
FIGURA 7: MECANISMO DE AÇÃO DOS LANTIBIÓTICOS POR FORMAÇÃO DE POROS (SHARMA K., 2021)	14
FIGURA 8: MECANISMO DE AÇÃO DOS LANTIBIÓTICOS POR INIBIÇÃO DA SINTESE DA PEREDE CELULAR (SHARMA K., 2021) ..	14
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO DO EPS - GERADO POR INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL (GEMINI, GOOGLE, 2026)	16
FIGURA 10: ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS EPS (Mouro, 2024)	17
FIGURA 11: ESTRUTURA HoPS e HePS (MINGYUE ZHOU, 2023).....	18
FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO CLA E SEUS ISÔMEROS PRINCIPAIS - GERADO POR INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL (GEMINI, GOOGLE, 2026)	18
FIGURA 13: (A) VIA DA FOSFOCETOLASE ESQUEMA SIMPLIFICADO (ÖZCAN, 2019) (B) VIA DA PENTOSE FOSFATO (NELSON & Cox, 2008)	21
FIGURA 14: DEXTRANO DE WEISSELLA CIBARIA OBSERVAÇÃO MET (TINGIRIKARI, 2014).....	22
FIGURA 15: WEISSELLA CIBARIA NUMA MATRIZ DE EPS - FONTE: GERADO POR IA (GEMINI, GOOGLE 2026)	23
FIGURA 16: TESTES BIOQUÍMICOS - FONTE: GERADO POR IA (GEMINI, GOOGLE 2026)	30
FIGURA 17: TESTE DE QUORUM SENSING EM WMAS 6%	40
FIGURA 18: TAXA DE CRESCIMENTO SEGUNDO A FONTE DE CARBONO E A TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO	47
FIGURA 19: CRESCIMENTO EM SACAROSE 2%	47
FIGURA 20: CURVA DE CRESCIMENTO GLUCOSE VS MANOSE	48
FIGURA 21: INFLUENCIA DO PH NO CRESCIMENTO	49
FIGURA 22: CRESCIMENTO A PH 7,65 E A PH 5.5.....	50
FIGURA 23: TESTE PROTEASE EM MEIO WMBA COM CASEÍNA BOVINA (V. MONTEIRO)	52
FIGURA 24: PRODUÇÃO DE CLA PELAS ESTIRPES DE WEISSELLA CIBARIA E LACTOPLANTIBACILLUS PLANTARUM	53
FIGURA 25: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA CONTRA BACILLUS CEREUS ATCC11778 (A) B. CEREUS NCTC11143 (B) CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (C) PENICILLIUM SPP (D) LISTERIA MONOCYTOGENES (E)	54
FIGURA 26: AÇÃO ANTIMICROBIANA CONTRA LISTERIA MONOCYTOGENES. AÇÃO DO CFS (A), DAS CÉLULAS NÃO LAVADAS (B), DAS CÉLULAS LAVADAS EM PBS (C), DAS CÉLULAS LISADAS COM O CFS (D).....	56
FIGURA 27: BACTERIOCINA LIGADA À SUPERFÍCIE. CRIADO POR IA (GPAI, 2026).....	57
FIGURA 28: PRODUÇÃO EPS EM WMAS6 NEGATIVO PARA PFM1660 E B391 (A) E POSITIVA PARA PFM1679 (B)	59
FIGURA 29: EFEITO DA DENSIDADE DE CÉLULAS DE WEISSELLA CIBARIA PFM1501 NA PRODUÇÃO DE EPS. POR ESGOTAMENTO (A) E POR ESPALHAMENTO (B)	59
FIGURA 30: SCREENING PRODUÇÃO DE EPS EM WMAS2 (A) E WMAS6 (B).....	60
FIGURA 31: TESTE DE QUORUM SENSING - CONTROLO NEGATIVO SEM INDUTOR (A) E COM INÓCULO (INDUTOR) CENTRAL DE ALTA DENSIDADE POTENCIAL FONTE DE QS (B)	61
FIGURA 32: PRODUÇÃO DE EPS EM PLACAS VS CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE CÉLULAS.....	61
FIGURA 33: DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS DO EPS DAS ESTIRPES. (GAL: GALACTOSE; GC: GLUCOSE; F: FRUTOSE; X: XILOSE; R: RAMNOSE; AR: ARABINOSE; MAN: MANOSE).....	62
FIGURA 34: FTIR COM ESPETRO DA AMOSTRA DE EPS HIDROLISADO DE WEISSELLA CIBARIA PFM1679 (A) E ESPETRO DA D-GLUCOSE (NATIONAL INSTITUT OF STANDARDS AND TECHNOLOGY)(B)	63
FIGURA 35: CROMATOGRAMA HPLC AMOSTRA EPS HIDROLISADO DE PFM1679	63
FIGURA 36: ATIVIDADE HEMOLÍTICA DAS WEISSELLA CIBARIA (A) E DA LISINA DESCARBOXILASE (B) – FONTE V. MONTEIRO. 65	
FIGURA 37: RESISTÊNCIA A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE NaCl	66

FIGURA 38: CAPACIDADE DE AUTOAGREGAÇÃO DE <i>WEISSELLA</i> AO LONGO DE 5H	72
FIGURA 39: RELAÇÃO ENTRE ÍNDICES DE AUTOAGREGAÇÃO E COAGREGAÇÃO	73

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: <i>WEISSELLA</i> EM DIFERENTES ECOSISTEMAS (FUSCO VINCENZINA, 2015)	23
TABELA 2: ESTIRPES DE <i>WEISSELLA</i> SPP DA COLEÇÃO DA UMA.....	26
TABELA 3: pH TESTADOS COM <i>WEISSELLA</i>	29
TABELA 4: ESTIRPES ALVO NA PESQUISA DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	36
TABELA 5: CÁLCULO DA TAXA ESPECÍFICA MÉDIA DE CRESCIMENTO DAS <i>WEISSELLA</i> CIBARIA PFM1501 E PFM1679	50
TABELA 6: RESULTADOS DOS TESTES FENOTÍPICOS.....	52
TABELA 7: TESTE DE INIBIÇÃO DE ANTIMICROBIANOS	55
TABELA 8: RESULTADOS DOS TESTES DE VIRULÊNCIA DAS ESTIRPES.....	64
TABELA 9: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO P-EPS DAS ESTIRPES PRODUTORAS DE EPS.....	67
TABELA 10: TESTE DE RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES 0,3%	68
TABELA 11: PERCENTAGEM DE REMOÇÃO DO COLESTEROL	69
TABELA 12: HIDROFOBICIDADE COM O XILENO.....	70
TABELA 13: CAPACIDADE DE COAGREGAÇÃO DAS ESTIRPES EM ESTUDO COM <i>SALMONELLA</i> E <i>ESCHERICHIA COLI</i>	73

ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS DO TRABALHO

A indústria alimentar tem de se reinventar constantemente e encontrar respostas biotecnológicas aos novos desafios que se lhe apresentam. Os principais são evidentemente os do “*Food Safety*” (segurança alimentar) e os do “*Food Security*” (alimentos para todos), pois conseguir acompanhar as necessidades inerentes ao crescimento da população mundial (10mil milhões até 2080 segundo dados da ONU (United Nations, 2024)) tornou-se o maior dos desafios.

Não menos relevantes são as necessidades inerentes à indústria alimentar: conseguir maiores prazos de validade dos produtos, necessidade duma maior sustentabilidade por meio da otimização de recursos e a redução de desperdícios, necessidade da criação de alimentos funcionais, como os probióticos por exemplo, e nutracêuticos (biofortificação, melhoria do perfil nutricional...) que vão ao encontro das tendências de preferência dos consumidores (Portugal Foods, 2026) e às suas necessidades implícitas.

Novas exigências impulsionaram ao longo dos séculos a procura por novos compostos de interesse industrial que possam oferecer os maiores rendimentos ao menor custo. O recurso às leveduras e às bactérias do ácido láctico (LAB) é, e continua a ser, a sua principal fonte de inspiração (Mora-Villalobos, 2020), seja em processos de fermentação (pão, queijos, vinho...), manutenção dos níveis de segurança alimentar, alargamento dos tempos de prateleira (Murata, 2025) ou na inovação de novos produtos alimentares. Na verdade, as LAB já são usadas empiricamente há mais de 4000 anos em processos fermentativos, sendo a técnica de conservação mais antiga.

As LAB são capazes de sintetizar inúmeros compostos, desempenhando um papel na indústria alimentar moderna que vai além da típica fermentação tradicional. Destaca-se a produção de vários metabolitos como polímeros, vitaminas, antioxidantes, enzimas funcionais fundamentais a vários processos, antimicrobianos, exopolissacarídeos, ácidos orgânicos (ácido láctico, acético...) e a utilização na indústria alimentar (Leroy F, 2004) de algumas espécies como probióticos.

Desde o surto de 2019 do COVID que se verifica uma maior consciencialização por parte dos consumidores para a “*Good Health*” (boa saúde), procurando comportamentos mais proativos como o recurso a alimentos mais saudáveis, suplementações, menos aditivos, etc. O setor dos probióticos tem vindo a aumentar fortemente, registando um crescimento de até cerca de 9% ao ano e esperando-se uma taxa de crescimento entre 7 e 10% em 2026 (Fortune Business Insights, 2026).

Nos alimentos, a acidificação promovida pelas LAB impede ou limita o crescimento de microrganismos indesejáveis, aumentando a segurança e o tempo de vida útil dos produtos (Piard JC, 2005). Mas, não menos relevante, é o facto de poderem produzir compostos aromáticos conferentes de sabor, como o diacetilo (sabor manteiga) ou vários aldeídos como o acetaldeído responsável pelo aroma característico a iogurte, sendo alternativas aos aromas sintéticos. Dentro do grupo das LAB temos o género *Weissella*, da família das *Lactobacillaceae*, que apresenta uma alta capacidade para a produção de metabolitos de grande interesse tecnológico. Destacam-se a produção de exopolissacarídeos (EPS) (Zhou B., 2024), bacteriocinas (Singh Jahnavi Kumari, 2024) ou outros compostos funcionais como enzimas, ácido linoleico conjugado (CLA), etanol, ácidos orgânicos ou como potenciais probióticos (Maślak, 2022).

O estudo e avaliação de várias estirpes selvagens de *Weissella*, todas provenientes da coleção da Unidade de Microbiologia Aplicada, pretende identificar as funcionalidades mais relevantes e aprofundar o conhecimento e características inerentes a cada uma delas para consequentemente as valorizar e procurar potenciais aplicações tais como o uso em processos de fermentações, probióticos, compostos bioativos, segurança alimentar, melhoramento de textura (tecnologia alimentar), alimentos funcionais (Fusco Vincenzina, 2015).

Este trabalho visa assim caracterizar e avaliar o potencial biotecnológico destas estirpes selvagens de *Weissella cibaria*, com vista à sua eventual aplicação na indústria alimentar ou de produtos por si produzidos.

Assim, os principais objetivos definidos foram:

- O isolamento, recuperação e seleção de 8 estirpes de *Weissella* da coleção da UMA (Unidade de Microbiologia Aplicada), e as suas

propagações para constituir as culturas de trabalho necessárias aos ensaios;

- Caracterização das estirpes selecionadas: taxa de crescimento, otimização dos parâmetros de crescimento (temperatura, pH, meio de cultura...);
- Avaliação da produção de metabolitos de interesse (bacteriocinas, enzimas funcionais, EPS...);
- Avaliação do potencial probiótico;
- Avaliação de parâmetros de segurança (resistência a antibióticos, fatores de virulência...).

O objetivo final será a seleção das estirpes com maior potencial para estudos futuros mais aprofundados.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A biotecnologia alimentar tem por vocação a pesquisa e/ou o uso de organismos vivos (microrganismos) ou de compostos por eles sintetizados (enzimas, antimicrobianos...), para produzir ou melhorar os nossos alimentos. Há milhares de anos que essa atividade está em constante evolução. Seja para melhorar os processos como as fermentações (queijo, vinho...), para a biopreservação e a segurança alimentar, seja para melhoria das propriedades nutracêuticas ou para a formulação e melhoramento dos alimentos. A indústria alimentar sempre teve essas necessidades, mas perante novas realidades, está a ser impulsionada para encontrar novas soluções às problemáticas levantadas pelas exigências dos consumidores, a inevitável consideração de sustentabilidade e a necessidade de produzir mais, a menores custos ou simplesmente inovar.

1. Novos compostos biotecnológicos e desafios da indústria alimentar

A procura de novos ingredientes ativos, “naturais” e seguros, a redução de aditivos químicos (*Clean Label*), a sustentabilidade (redução de desperdícios) ou o uso em saúde-e-bem-estar (probióticos, antioxidantes...), levam a indústria alimentar à constante procura de bioprodutos, principalmente os de origem microbiana como bacteriocinas, EPS ou enzimas entre outros (Carvalho, 2015; Dillon, 2014; Leroy F, 2004; Murata, 2025), fundamentada na eficiência cinética (crescimento rápido permitindo mais ciclos de colheita), a versatilidade metabólica (melhoramento através de engenharia genética), no controlo paramétrico e a sustentabilidade dos processos (valorização de resíduos e subprodutos).

A identificação microbiana, e o estudo da sua bioquímica, é uma ferramenta da microbiologia industrial para a deteção e utilização de microrganismos com potencial biotecnológico significativo (Chettri, 2024). Bactérias e fungos são os que mais contribuem devido à importância que representam em vários processos naturais como as fermentações ou produção de metabolitos. Das bactérias, as LAB são as de maior relevância. Existem muitos estudos sobre a produção de compostos bioativos pelas LAB, sejam eles focados nas suas bacteriocinas ou na produção de EPS por exemplo. No entanto, pecam por serem realizados e analisados à escala laboratorial e nem sempre são projetados para a realidade

da escala industrial. De igual modo, faltam também estudos de estabilidade em matrizes alimentares, ensaios funcionais em alimentos, avaliação toxicológica (fatores de virulência, genes de resistência a antibióticos...). (Generalic Mekinić, 2025)

1.1. Segurança Alimentar / Aumento do tempo de prateleira

Para evitar o uso de tratamentos físicos demasiados agressivos para as matrizes alimentares, principalmente os térmicos (esterilizações, pasteurizações...) e para garantir a segurança do alimento, a utilização das bacteriocinas é frequente no biocontrolo de patogénicos (Fernandes, et al., 2017) ou na biosanitação de embalagens em contato com alimentos (Mauriello, 2004; Loureiro, 2015). Por exemplo, a nisina, cujo uso está aprovado pela FDA, é usada em mais de 48 países como conservante alimentar natural, inibindo o crescimento duma vasta gama de bactérias Gram-positivas como a *Listeria monocytogenes*, por exemplo. O uso direto do microrganismo ou dos seus metabolitos pode aumentar o tempo de prateleira através do controlo ou da inibição de microrganismos deteriorantes (Balciunas E.M., 2013) ou mesmo de patogénicos.

As LAB podem ser utilizadas em processos fermentativos, em conjunto com as culturas *starter*, para potenciar sabores (por exemplo nos queijos), tornando-se um aliado precioso no controlo das reações e das contaminações por competição ou por produzir vários ácidos orgânicos (Negash & Tsehai, 2020).

1.2. Tendências de consumo

Cada vez mais consumidores valorizam a substituição dos aditivos químicos em alimentos por compostos mais “naturais” (van Gunst, 2019). Embora os famosos “E”, autorizados na União Europeia, sejam sujeitos a rigorosas avaliações pela EFSA, persiste a perceção da artificialidade prejudicial nos alimentos. Um estudo de 2021 conduzido pelo Instituto Federal Alemão de Avaliação de Risco (BfR), indicou que mais de metade dos inquiridos (55%) afirmam evitar o consumo de alimentos com aditivos contendo a letra E (BfR – Bundesinstitut für Risikobewertung, 2021). A própria legislação europeia segue essa tendência como por exemplo a recente redução do teor máximo de nitritos nas carnes processadas, que terá de ser compensada por um maior controlo da sua microbiota. Por exemplo, um estudo (Liu X. Q., 2020) mostrou que a utilização de duas LAB (*Weissella cibaria* e *W.confusa*) como cultura *starter* no processo

de fermentação de enchidos, permitia compensar níveis de nitritos menores. Essas LAB conseguiram a potencialização das propriedades sensoriais (aumento da cor vermelha, dureza, textura) do enchido, mantendo níveis de segurança alimentar aceitáveis por ação direta dos ácidos orgânicos (menor pH) produzidos e pela diminuição da atividade da água resultante da sua atividade. A resposta da indústria alimentar poderá dessa maneira consistir na procura de alternativas eficazes e aceitáveis, equacionando a utilização de compostos antioxidantes, vitaminas, ácidos-gordos e pigmentos com potencial funcional, todos eles produzidos por microrganismos.

1.3. Proteínas alternativas

A produção de proteínas alternativas é uma área da agricultura celular e da fermentação de precisão. Consiste em processos de fermentação por bactérias ou leveduras geneticamente modificadas. Pode constituir uma resposta às tendências vegan. Por exemplo a produção de proteína de leite (caseína e *whey*) por microrganismos, sem a presença animal (Knychala, 2024).

1.4. Metabolitos tecnofuncionais

Alguns compostos produzidos por microrganismos apresentam utilidade tecnológica como os exopolissacarídeos microbianos (EPS), com funções de espessantes, estabilizantes ou tixotrópicos (Ruas-Madiedo P, 2002).

Outros, como o grupo das enzimas (figura 1), usados na melhoria de processos como os da panificação (amílases) ou produção de queijos, são ferramentas para alterar propriedades sensoriais (ex. lipases), texturais (ex. proteases) ou para aumentar rendimentos na extração de sumos (ex. pectinases) (Kumar A., 2024; Sharma A. G., 2019)

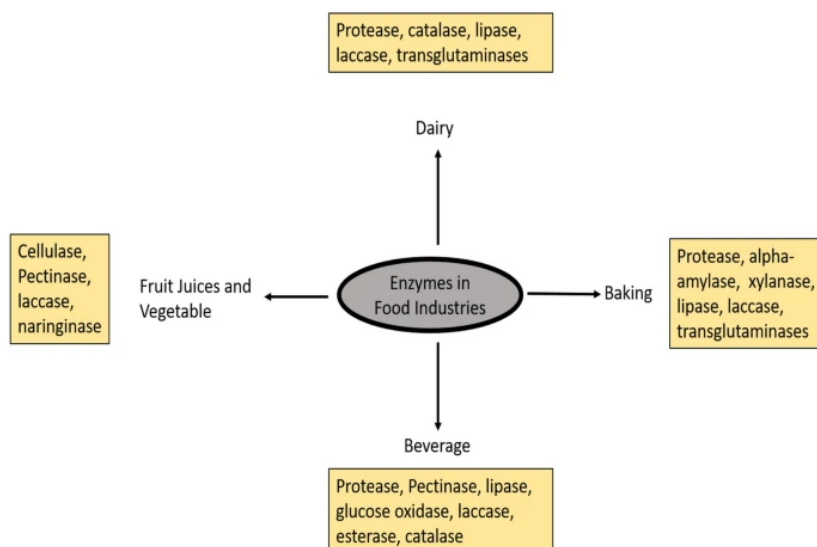


Figura 1: principal utilização das enzimas na indústria (Kumar A., 2024)

Existe ainda um conjunto mais alargado de outros compostos como os ácidos orgânicos, vitaminas, pigmentos microbianos (com propriedades antioxidantes, corantes, anti-tumorais ou anti-inflamatórias), compostos de aroma (diacetilo, esterres e aldeídos) ou bioemulsionantes que podem substituir lecitinas e outros emulsionantes sintéticos (Chen, 2018; Duarte, 2019; Fusco Vincenzina, 2015).

2. Limitações dos métodos clássicos na identificação e seleção de estirpes de interesse tecnológico

As técnicas de identificação da microbiologia clássica baseiam-se sobretudo na análise fenotípica e morfológica, apoiando em técnicas dependentes de cultivo (meios específicos, condições controladas de temperatura, pH e atmosfera, fatores de crescimento...). Essas técnicas foram desenvolvidas principalmente a partir dos trabalhos de Robert Koch e de Louis Pasteur, pelo que são atualmente métodos muitos robustos e que continuam a ser o padrão em certos contextos clínicos e industriais. Têm evidentes limitações na capacidade de capturar toda a diversidade microbiana e nos tempos de obtenção de resultados. Assim, a bibliografia indica que os métodos dependentes de cultivo conseguem abranger apenas 1% dos microrganismos presentes na natureza (Prakash, 2013). Para além disso, os métodos são lentos e de baixo rendimento, e nem sempre se conseguem as condições de cultivo que cada estirpe encontra

normalmente nos seus habitats naturais e que lhes permitem uma expressão metabólica plena (Alain, 2009).

Por outro lado, as ferramentas de análise genómica são atualmente poderosos instrumentos de identificação e caracterização de microrganismos. Através de sequenciação pode-se realizar o *screening* de potenciais compostos (*genome mining*), através da exploração de dados genómicos para identificar genes funcionais e metabólicos, com ajuda de ferramentas de bioinformática aplicada a cada estirpe microbiana isolada (Boutin & Dalpke, 2020).

Assim, num grupo tão vasto como o da Ordem das *Lactobacillales*, sendo a capacidade de discriminação muito baixa com as ferramentas da microbiologia clássica, a identificação da espécie pode ser problemática, pois têm características muito próximas. Recorre-se então a técnicas mais avançadas de biologia molecular, como a sequenciação e análise genómica, para uma identificação mais assertiva recorrendo à bioinformática e bases de dados genómicos. Por vezes essa análise leva à criação de novos géneros, como o proposto em 1993 por Collins (Collins MD, 1993) para *Leuconostoc paramesenteroides* e alguns *Lactobacillus* heterofermentativos. Collins, após análise dos resultados das sequenciações do gene 16S rDNA, chegou à conclusão de que as estirpes eram demasiadas diferentes do género onde estavam classificadas (*Leuconostoc* e *Lactobacillus*). Propôs que fossem renomeadas num novo género chamado *Weissella* (figura2). Collins foi assim o pai do género *Weissella*, cujo nome foi dado em homenagem ao microbiologista alemão Norbert Weiss pela sua contribuição ao estudo das LAB.

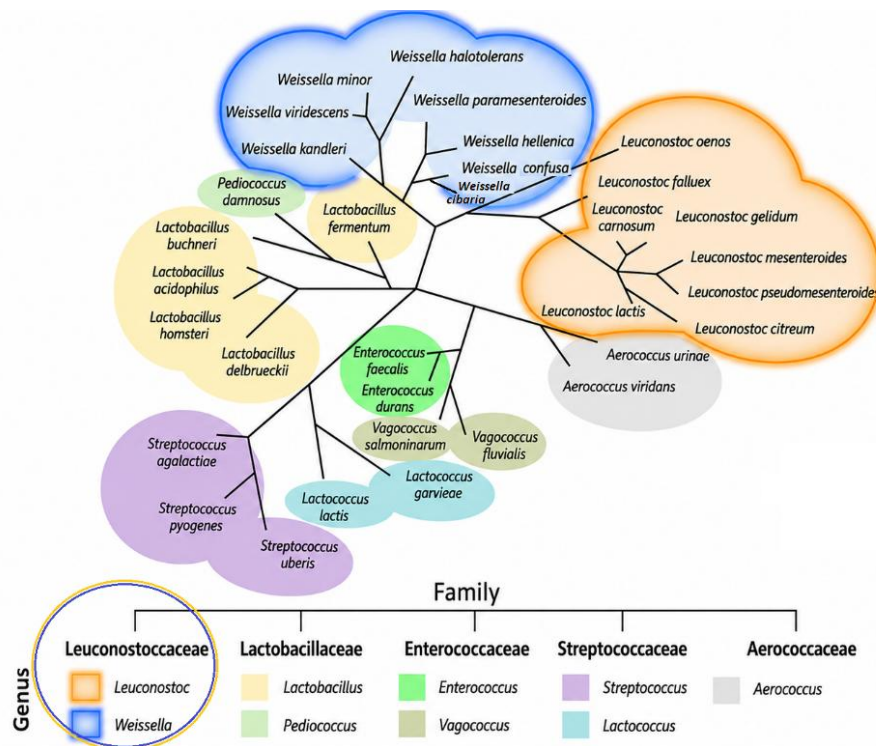


Figura 2: Árvore filogenética mostrando a proximidade de *Weissella* com outras LAB inspirado de (Collins MD, 1993)

Muitos microrganismos possuem genes de interesse para a produção de compostos com potencial biotecnológico, mas que permanecem “silenciosos” na ausência das condições culturais ideais ou de estímulos provenientes dos seus ecossistemas (stress nutricional, competição interespecífica...). O “*genome mining*” é uma abordagem bioinformática que permite identificar novos produtos por meio da análise de genomas microbianos sequenciados, identificando *in silico* clusters de genes biossintéticos e os metabolitos resultantes das expressão dos mesmos (Zhongyue Li, 2018; Biermann, Wenski, & Helfrich, 2022). Esse método pode levar à descoberta de muitas substâncias novas com potencial interesse.

3. Bactérias do ácido láctico (LAB)

As LAB são um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas em forma de bacilos ou cocos sem motilidade (figura 3), constituído por 11 géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* (Sabo, 2014) (Carvalho, 2015) e *Fructobacillus* (Dillon, 2014). São catalase e oxidase negativas e não são esporuladas. Conseguem crescer em meio ácido.



Figura 3: Representação morfológica característica do grupo LAB, bastonetes (*Lactobacillus* spp.) e cocos organizados em cadeias (*Streptococcus* spp. ou *Lactococcus* spp. Fonte: Gerado por Inteligência Artificial (Gemini, Google, 2026)

As LAB constituem um microbiota naturalmente presente na natureza pelas suas fortes capacidades de adaptação. Estão, por isso, presentes nas diversas matrizes alimentares, nos animais, plantas e nos seres humanos (microbiota intestinal ou urogenital, por exemplo). A maioria dos géneros são reconhecidos pela FDA (Food and Drug Administration, USA) ou a EFSA (European Food Safety Authority) como seguros sendo considerados como GRAS (Generally Recognized as Safe - FDA) ou QPS (Qualified Presumption of Safety - EFSA) isentando-os de aprovação como aditivos alimentares (Guerreiro, 2014).

3.1. LAB produtoras de metabolitos

3.1.1. Antimicrobianos

3.1.1.1. Atividade antimicrobiana

As LAB são conhecidas pela sua produção de bacteriocinas. São respostas contra competidores no microambiente onde as LAB evoluem. Não são antibióticos, mas sim peptídeos sintetizados pelos ribossomas das células bacterianas LAB e, na maioria das vezes, são libertadas para o meio exterior com o propósito de limitar ou atuar sobre um determinado microrganismo alvo (patogénico ou competidor), podendo mesmo ser outras LAB. Elas exercem assim um efeito bacteriostático e/ou bactericida tornando-as de grande potencial na segurança alimentar (Fernandes, et al., 2017; Guerreiro, 2014; Macieira A., 2018) inativando patogénicos como, por exemplo, a *Listeria monocytogenes* ou promovendo estabilidade do produto, aumentando o tempo de prateleira por inibição de microrganismos de deterioração. (Yi, 2023; Singh N, 2025).

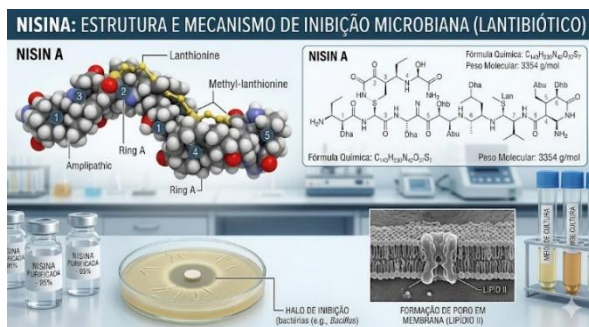


Figura 4: Representação da nisina - Fonte: Gerado por Inteligência Artificial (Gemini, Google, 2026)

A bacteriocina mais conhecida é a nisina (figura 4), descoberta em 1947 e considerada GRAS em 1969, amplamente usada na indústria alimentar (Cotter P. D., 2005) (Delves-Broughton, 1996). Entrou na lista dos aditivos nos anos 80 como sendo o conservante E234 com

efeito antimicrobiano contra Gram-positivos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* (Zacharof & Lovitt, 2012)

Existem hoje centenas de bacteriocinas conhecidas. Com estudos cada vez mais definidos, a classificação das bacteriocinas tem vindo a mudar. Não existe uma classificação universal e alguns autores propõem uma classificação própria ou com pequenas distinções (Sharma K., 2021) (Zimina, 2020). Num artigo de revisão mais recente de Solis-Balandra (Solis-Balandra MA, 2024) o autor faz uma atualização da classificação que agrega o maior consenso, proposta por Cotter (Cotter P. D., 2013), e que define as bacteriocinas em 2 grupos:

- **Bacteriocinas de Gram-positivos**

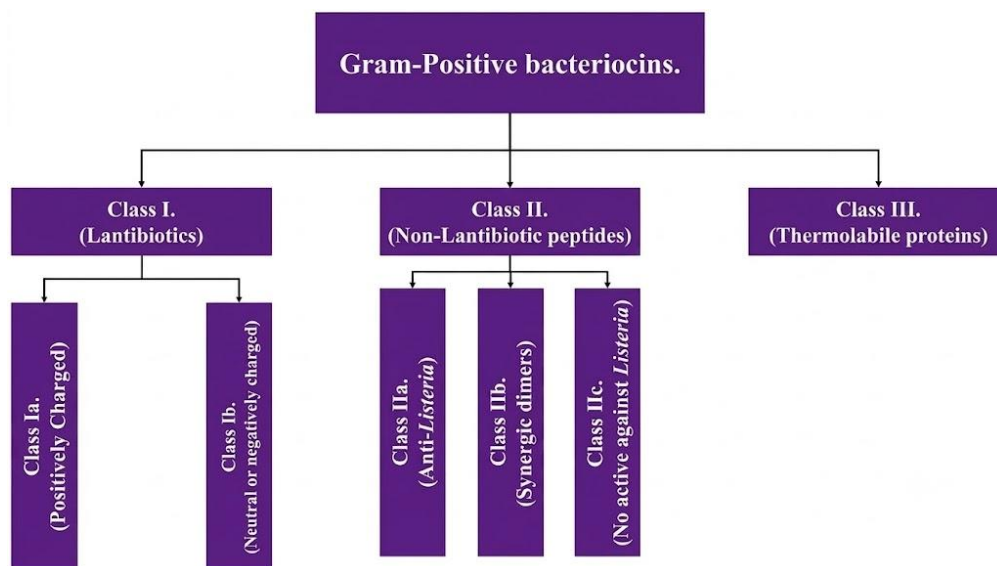


Figura 5: classificação de bacteriocinas de Gram-positivos adaptado por Solis-Balandra (Solis-Balandra MA, 2024) de Sharma (Sharma K., 2021))

Maioritariamente produzidas pelas LAB, são principalmente ativas contra bactérias Gram-positivas. Estas bacteriocinas estão subclassificadas em 3 classes (figura 5). A diferença entre cada grupo deve-se à presença (Classe I) ou

ausência (Classe II) de modificações pós-traducionais (PTMs) As de Classe III correspondem às que apresentam estrutura terciária e são denominadas de bacteriolisinas (Cotter P. D., 2013).

NB: As PTMs são alterações químicas covalentes na cadeia polipeptídica após a síntese da bacteriocina que leva a funções e propriedades alteradas ou diferentes.

As bacteriocinas de **classe I** são conhecidas como **lantibióticos**, sendo termoestáveis e de baixo peso molecular (<5kDa). Esta classe está dividida em 2 subclasses a **Ia** e **Ib**. A **Ia**, onde está incluída a nisina, são peptídeos lineares e flexíveis de carga positiva, que atuam sobre as membranas formando poros. As **Ib**, de carga neutra ou negativa, são peptídeos globulares que atuam enzimaticamente interferindo no metabolismo celular.

As da **classe II** (Não lantibióticos), também têm baixo peso molecular (<10kDa) e constituem a maior parte das bacteriocinas. Estão divididos em 3 subclasses: A **Ila** tem uma ação contra *Listeria* (Negash & Tsehai, 2020) e são estruturalmente análogas à pediocina (Pérez-Ramos A. M.-M., 2021). São exemplos algumas sakacinas, staphylococquinas, e algumas enterocinas. A **Ilb** é constituída de peptídeos que atuam numa conformação dimérica (Sharma K., 2021) em sinergia. São exemplos a plantaricina EF (*Lactiplantibacillus plantarum*), a lactacina F ou a lactococcina G e M. A **Ilc** são peptídeos que não pertencem às outras subclasses, de estrutura circular ou linear mas que não têm efeito contra a *Listeria*. (Sharma K., 2021) como a enterocina SL-5 de *Enterococcus faecalis* por exemplo (Pérez-Ramos A. M.-M., 2021)

A **classe III** abrange as bacteriocinas com alto peso molecular (>30kDa). Possuem estrutura terciária complexa o que as torna termolábeis. São exemplos a helveticina J, a acodofilina A ou a lisostafina (*Staphylococcus simulans*) (Pérez-Ramos A. M.-M., 2021).

As bacteriocinas de Gram-positivos são geralmente produzidas no fim da fase exponencial de crescimento e ao longo da fase estacionária (Gillor, 2008; Piard, 1992).

- **Bacteriocinas de Gram-negativos**

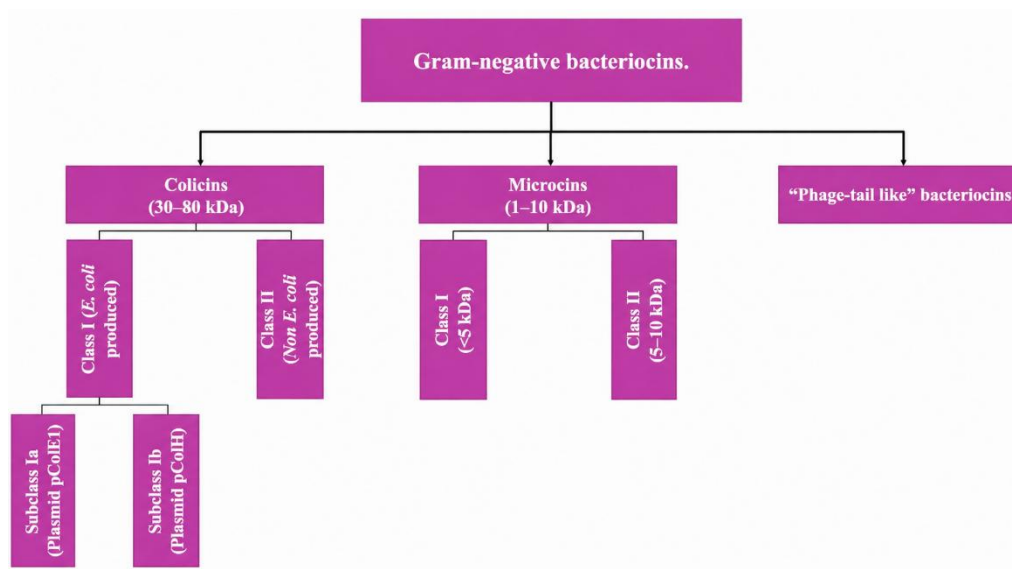


Figura 6: esquema da classificação de bacteriocinas de Gram-positivos (adaptado por (Solis-Balandra MA, 2024) de (Pérez-Ramos, Madi-Moussa, Coucheney, & Drider, 2021))

Em geral, essas bacteriocinas são produzidas principalmente por algumas estirpes de *Escherichia coli* ou outras *Enterobacteriaceae*. Dada a escassez de informações disponíveis sobre esse tipo de bacteriocinas, a classificação limita-se a 2 subclasses: as colicinas (30-80kDa) e as microcinas (1 a 10kDa) cuja diferença se baseia no peso molecular (Sharma K., 2021; Negash & Tsehai, 2020). No entanto, uma terceira subclasse ainda pouco caracterizada pode ser considerada, onde a atividade antimicrobiana assenta na sua estrutura. Não há ainda muita informação sobre essas bacteriocinas (Pérez-Ramos, Madi-Moussa, Coucheney, & Drider, 2021). Não são bacteriocinas produzidas pelas LAB e muitas têm origem em plasmídeos.

Modo de ação das bacteriocinas

O modo de ação das bacteriocinas mais comum (lantibióticos, classe I) e mais estudadas divide-se em 2 mecanismos.

O primeiro provoca uma perda de integridade da membrana celular criando a formação de poros nas membranas citoplasmáticas (figura 7). A ação da bacteriocina (por exemplo a galidermina) no chamado lípido II destabiliza localmente a membrana (perda de potencial de membrana) criando um poro que leva à perda de solutos e biomoléculas (Sharma K., 2021).

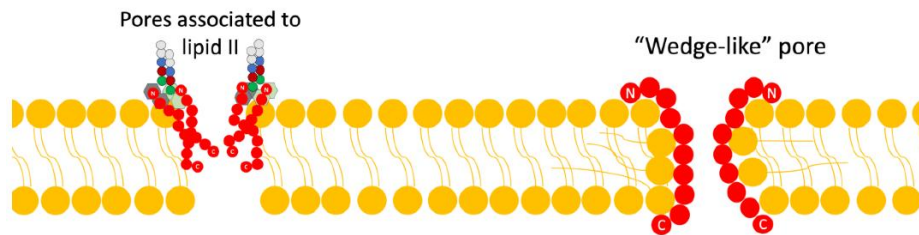


Figura 7: Mecanismo de ação dos antibióticos por formação de poros (Sharma K., 2021)

O segundo mecanismo provoca a inibição da síntese da parede celular (figura 8). O bloqueio da integração da D-alanina na parede inibe a síntese do peptidoglicano (Sharma K., 2021).

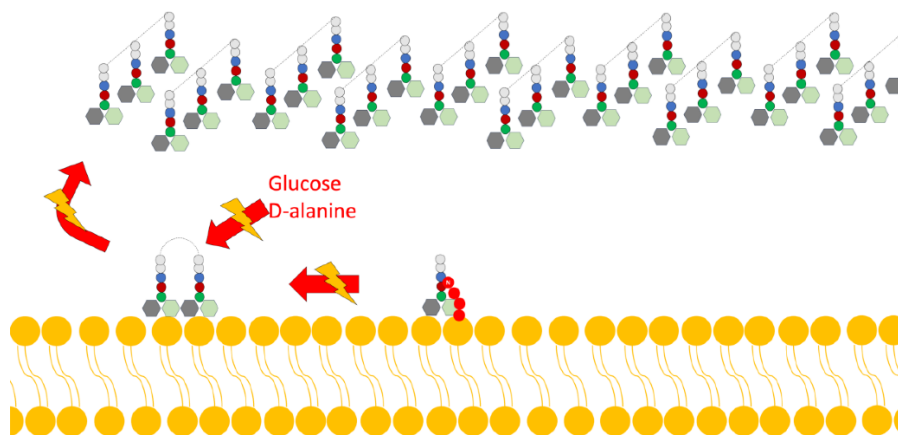


Figura 8: Mecanismo de ação dos antibióticos por inibição da síntese da parede celular (Sharma K., 2021)

Ambos levam à destabilização e morte celular. No geral, a ação nas bactérias Gram-negativas é bastante limitada devido à constituição da membrana (peptidoglicano) diferente das Gram-positivas.

3.1.1.2. Outros antimicrobianos

As bactérias do ácido lático (LAB) pertencem a um grupo de bactérias conhecidas por produzir diversos outros antimicrobianos. Os mais frequentes são os ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, o ácido acético e o ácido propiónico, que pela acidificação da matriz cria um ambiente inapropriado ao crescimento de vários microrganismos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Peng, 2022) (Manguntungi B., 2021). São geralmente produzidos em processos fermentativos e têm como outro efeito aumentar o efeito antibacteriano de certos compostos fenólicos encontrados em subprodutos alimentares (Todorov S.D., 2025; Sinaga D.P., 2021). Nas LAB, para além da produção de ácidos orgânicos.

outros compostos antimicrobianos podem ser produzidos como o peróxido de hidrogénio (forte oxidante) (Todorov, et al., 2024). Geralmente a sua produção está combinada com a produção de bacteriocinas, principalmente quando a LAB compete com outros microrganismos por nutrientes limitados, reduzindo ainda mais a concorrência (Dillon, 2014).

Algumas estirpes produzem diacetilo quando o metabolismo de açúcares passa pela via do piruvato, em condições aeróbicas e pH baixos (4,5-5,5). Esse composto atua como antimicrobiano quando se encontra em altas concentrações e tem um impacto mais significativo nas Gram-negativas e fungos (Dillon, 2014).

3.1.2. Enzimas

O uso de enzimas tem um papel fundamental em muitos processos industriais, particularmente na indústria alimentar. As enzimas microbianas destacam-se pelo facto de serem mais estáveis do que as que são extraídas de plantas ou animais, para além de que são de obtenção (extração/purificação) mais económica, fácil, rápida e de pouco investimento (Raveendran, 2018).

São alguns exemplos

- as carboenzimas ou enzimas carbo-hidratases: São exemplos as amilases na panificação (α -amilase de *Aspergillus spp*) ou na produção de xarope de glucose com amilase termoestável e robusta produzida por *Bacillus licheniformis* (de Souza PM, 2010) ou as pectinases que aumentam os rendimentos de extração e ajudam na clarificação de sumos de fruta ou na produção de vinho (Ma, 2018; Rebello S., 2017).
- as proteases como a quimosina (coalho) no fabrico de queijos (Kumar, 2010) ou as transglutaminases no amaciamento de carnes (Duarte, 2019)
- as hidrolases como as lipases ou as estereases microbianas representam 90% do mercado global das lipases (Guerrand, 2017). Estereases e fosfolipases são usadas no desenvolvimento de aromas nos queijos ou na produção de margarinas sem ácidos gordos *trans* por esterificação (Mensink RP, 2016).
- as glicósido-hidrolases como a β -galactosidase (lactase) na redução da lactose no leite (Husain, 2010) ou a invertase na hidrólise de sacarose

para xaropes invertidos destinados à pastelaria e confeitaria (Kotwal, 2009)

As LAB produzem um conjunto de enzimas intracelulares, extracelulares e associadas à membrana celular, nomeadamente

- Enzimas do sistema proteolítico como as proteases e peptidases intracelulares (aminopeptidases, prolinases...) (Savijoki K., 2006) com aplicação na maturação de queijos;
- β -galactosidase produzida por *Lactobacillus* e com aplicação na redução de lactose em laticínios;
- Enzimas de polissacarídeos e exopolissacarídeos (EPS) produzidas por exemplo por *Weissella cibaria* (Amaretti A., 2020), como a glicosiltransferase, a glucano-sucrase (GS) ou a frutano-sucrase (FS) (Zeidan A. A, 2017) na produção de dextrano ou levano a partir da sacarose;
- Enzimas relacionadas com compostos bioativos e antioxidantes como a Glutamato descarboxilase (GAD) na produção de GABA (ácido γ -aminobutírico) com propriedades nutracêuticas (Fashogbon R.O., 2024) (Xie X., 2023) ou as fenol-ácido descarboxilase (PAD) e redutase na transformação de compostos fenólicos em compostos bioativos e antioxidantes (Pasquale Filannino, 2015).

3.1.3. Exopolissacarídeos (EPS)



Figura 9: Representação do EPS - Gerado por Inteligência Artificial (Gemini, Google, 2026)

Segundo a IUPAC, os EPS são macromoléculas de monossacarídeos unidas por ligações glicosídicas, com estruturas químicas variáveis (figura 9) (IUPAC, 2009). Os EPS podem ter uma origem natural vegetal ou animal (Amido, Inulina, Quitina...) (figura 10).

No entanto, os de maior interesse industrial são obtidos *via* fermentação microbiológica (xantana, dextrano,

levano...) e podem ser produzidos por determinadas espécies de bactérias e fungos. Os EPS de origem microbiana são biopolímeros que, em meio aquoso, formam géis, uma propriedade com alto potencial de aplicação no setor industrial (Sutherland, 1998).

Os EPS podem atuar como agente de viscosidade, emulsificante, gelificante ou estabilizante (Ruas-Madiedo P, 2002). A produção comercial de EPS foca-se principalmente na produção de dextrano pelas espécies *Leuconostoc* com rendimentos de 10 mg/L até 1 g/L (Fessard & Remize, 2017). No entanto, vários estudos apontam produções elevadas de EPS (dextrano) de elevado peso molecular (10^6 - 10^8 Da), com rendimentos até 38 g/L, por parte de *Weissella cibaria* (Zannini E. M., 2013; Rao, 2013). Esse EPS é uma alternativa para a indústria com particular interesse na produção industrial de fermento natural ou na alteração e melhoramento de textura e propriedades sensoriais de alguns alimentos como o puré de cenoura por exemplo (Juvonen, 2015).

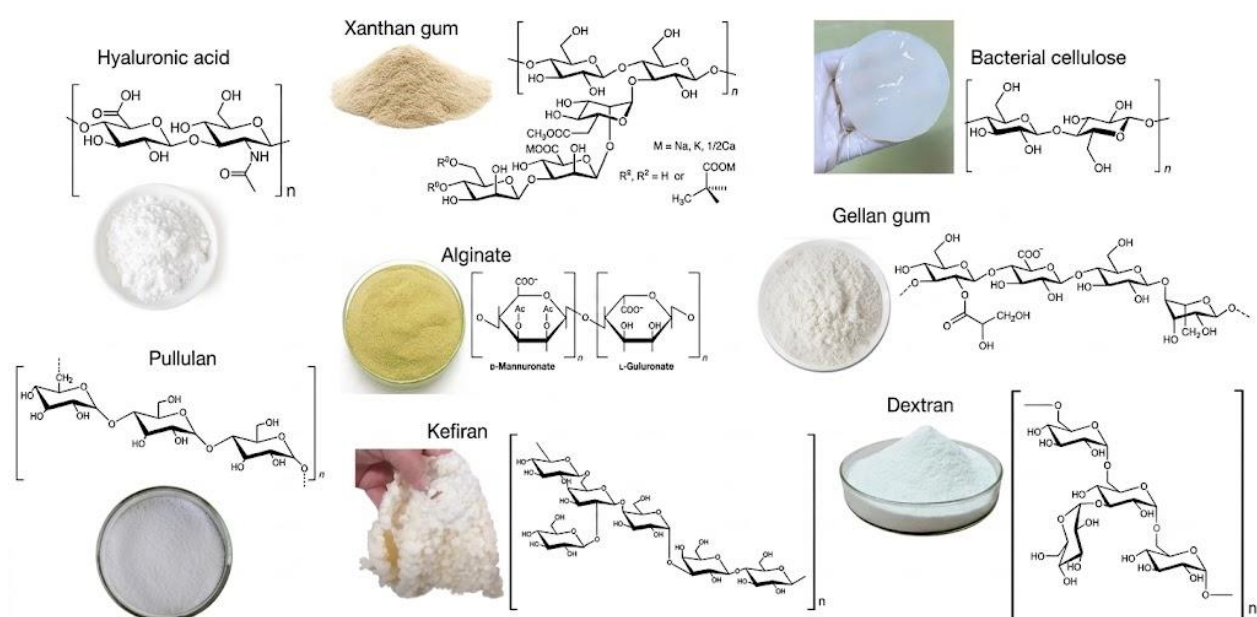


Figura 10: Estrutura química dos principais EPS (Mouro, 2024)

Os EPS podem ser classificados, na base da estrutura da cadeia de hidratos de carbono que os constituem: homopolissacarídeos (HoPS) e heteropolissacarídeos (HePS) (Salimi, 2023). Os HoPS são constituídos por um único monossacarídeo enquanto os HePS podem ser constituídos por 2 ou mais, ligados em cadeia simples ou cadeias ramificadas (figura 11).

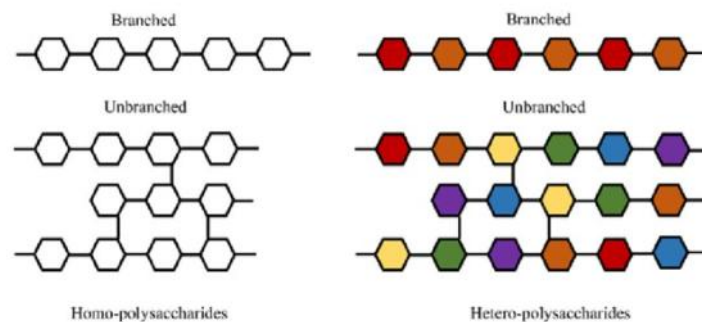


Figura 11: estrutura HoPS e HePS (Mingyue Zhou, 2023)

A sacarose, por noma, é a fonte de carbono obrigatória para tal síntese, usando enzimas altamente específicas como a glicosiltransferase, a glucano-sucrase (GS) ou a frutano-sucrase (FS) (Zeidan A. A, 2017)

3.1.4. Ácidos gordos

- Acido Linoleico Conjugado



Figura 12: Representação CLA e seus isômeros principais - Gerado por Inteligência Artificial (Gemini, Google, 2026)

Os Ácidos Linoleicos Conjugados (CLAs), isômeros do ácido linoleico (LA) (figura 12), são resultantes do metabolismo microbiano do trato digestivo dos ruminantes e acabam por se acumular naturalmente nas carnes ou laticínios (Salsinha, Machado, Rodríguez-Alcalá, Gomes, & Pintado, 2022). Têm efeitos benéficos na saúde (Kim JH, 2016) por terem potencial na redução da gordura corporal, na regulação da glicemia ou na modulação da

resposta imunitária (Lehnen T.E., 2015; Malinska H, 2015), oferecem benefícios anti-inflamatórios, antioxidantes e propriedades anti carcinogénicas (De Lima R.N., 2018; Dachev M, 2021). No entanto, a quantidade de CLA presente nesses produtos é insuficiente para preencher as necessidades de saúde dos consumidores (Cem Okan Özer, 2020). A produção direta de origem microbiana de CLA permite uma perspectiva de aplicação na indústria alimentar pela sua alta capacidade de biossíntese e a pureza do produto obtido através de processos de extração e purificação simples e económicos. As principais produtoras são bactérias do ácido láctico como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* (Wu C., 2024)

- Ácidos Gordos de cadeia curta

Os ácidos Gordos de cadeia curta (SCFAs ou AGCC), são metabolitos produzidos especificamente por bactérias da microbiota intestinal humana (SCFAs-producing bactéria) a partir de fibras ou de amidos resistentes (Fusco, 2023). A maioria dessa microbiota (exceto as LAB) produz o butirato que é o principal regulador imunológico intestinal (van der Hee B., 2021). Poucas espécies produzem propionato e acetato (Ara Koh, 2016; J.H. Cummings, 1987). São essenciais para o bom funcionamento da barreira intestinal, principalmente a sua integridade e permeabilidade (Chen, 2018) Também tem um papel importante na regulação de vários processos fisiológicos do sistema nervoso (Filipe De Vadder, 2014).

- Acetato

Entre as LAB do microbiota intestinal a produção de acetato é frequente nos *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* e *Lactococcus* entre outros (Tang H, 2023). O propionato pode ser produzido por alguns *Lactobacillus* em condições muito específicas (Krooneman, 2002) e muitas vezes resulta duma interação com outros microrganismos da microbiota (Stasiak-Róžańska L, 2025). O butirato é raramente produzido pelas LAB. Os principais grupos produtores são não-LAB e pertencem à família dos Clostrídios.

3.1.5. Vitaminas

A maioria das LAB é auxotrófica para diversas vitaminas (Rossi, 2011). A produção desses compostos pelas LAB é uma das áreas mais dinâmica de estudos. Este apontam para uma produção de vitaminas, principalmente do complexo B, pelos géneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* com forte capacidade de biossíntese de folatos (vitamina B9) (Rossi, 2011), riboflavina (vitamina B2) e cobalamina (vitamina B12) (G. LeBlanc, 2011). Essa produção é muitas vezes dependente de precursores (ex. o ácido para-aminobenzóico pABA para folatos) e da estirpe usada, com taxas de rendimento muito diferentes consoante a espécie considerada. Para além disso os rendimentos obtidos são geralmente baixos, necessitando uma combinação com estirpes específicas de *Propionibacterium* (uma LAB anaeróbia) para se efetivar uma biofortificação *in*

situ interessante (Henok Ashagrie, 2025). Estirpes selecionadas e manipuladas (engenharia metabólica) têm atualmente maior capacidade de produção (Sybesma, 2004). Algumas *Weissella*, principalmente *W.cibaria* e *W.confusa*, aparecem como estirpes promissoras na produção de riboflavina (Hernández-Alcántara AM, 2022) apesar da escassez de estudos realizados nesta área.

3.1.6. Antioxidantes

Existem dois tipos de atividade antioxidante. A que resulta de mecanismos diretos envolvendo sistemas enzimáticos (catalase, oxidase-peroxidase...) que têm uma ação direta na inibição dos radicais oxidantes. E outra, que resulta de mecanismos indiretos (atividade antioxidante), caracterizada pela produção de metabolitos não enzimáticos (ácidos orgânicos, EPS...) que atuam sequestrando radicais livres (EPS) ou pela via da quelação de metais pro-oxidantes (ácidos orgânicos). Ambos tem como objetivo a redução do stress oxidativo (A.T. Adesulu-Dahunsi, 2018; Ampemohotti, 2025).

As LAB não atuam produzindo um antioxidante único. Geralmente combinam enzimas antioxidantes, metabolitos secundários antioxidantes, quelação de metais e sistemas de reparação redox (Xiao, 2025). As estirpes de *Weissella* mostram uma relação entre a atividade antioxidante e a sua capacidade de produção de EPS (Sharma P. S., 2024).

3.2. *Weissella*

3.2.1. Género *Weissella*

O género *Weissella* pertence ao Filo das *Firmicutes*, Classe *Bacilli*, Ordem *Lactobacillales*, Família das *Leuconostocaceae* e faz parte de um grupo de bactérias chamadas de Bactérias do Ácido Láctico (BAL ou LAB) devido à sua capacidade de produzir ácido láctico a partir da fermentação de diversos açúcares como a glucose, maltose, manose ou sacarose. São bactérias anaeróbias facultativas, sem mobilidade, em forma de bacilos curtos (cocobacilos), gram-positivas, catalase negativa e não forma esporos (Collins MD, 1993).

Bactérias do género *Weissella* possuem um metabolismo fermentativo obrigatório. São heterofermentativas, ou seja, fermentam açúcares, mas não produzem apenas ácido láctico, mas sim outros subprodutos como etanol e/ou outros ácidos orgânicos, com produção de gás (CO₂). Para tal elas utilizam a via

metabólica da fosfocetolase (ou via 6-fosfogluconato/fosfocetolase) e da hexose monofosfatase (ou via das pentoses fosfato) (Garvie, 1967; Holzapfel W. H, 1982), que são vias metabólicas alternativas à glicólise.

A primeira via (figura 13 A) produz principalmente lactato, mas também outros produtos como o ácido acético ou o etanol a partir de pentoses ou hexoses. (Collins MD, 1993; Björkroth J, 2014). É uma via de catabolismo anaeróbico.

A segunda via fermentativa (figura 13 B) gera NADPH (coenzima importante com poder redutor nas reações biossintéticas) e pentoses que podem voltar a ser usados pela via da fosfocetolase. Esta é uma via de catabolismo oxidativo.

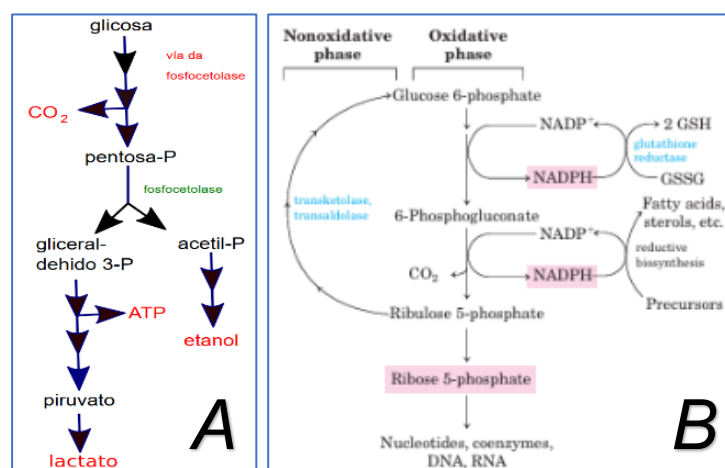


Figura 13: (A) via da fosfocetolase esquema simplificado (Özcan, 2019) (B) via da pentose fosfato (Nelson & Cox, 2008)

Weissella tem necessidades nutricionais complexas (Gandra EA, 2008; Björkroth J, 2014) como aminoácidos. Dependem do sistema proteolítico para obter aminoácidos essenciais, ácidos gordos e hidratos de carbono fermentáveis como a glucose, a maltose, a manose, a sacarose. Certas vitaminas são essenciais ao seu desenvolvimento principalmente as do grupo B como a tiamina, a riboflavina, o ácido fólico, a biotina entre outros. Todos esses nutrientes podem ser encontrados com facilidade nas matérias-primas usadas na indústria alimentar como o leite, a carne e os vegetais.

O Género *Weissella* é atualmente constituído por 25 espécies validadas como *W. viridescens*, *W. paramesenteroides*, *W. confusa*, *W. kandleri*, *W. halotolerans*, *W. minor*, *W. hellenica*, *W. thailandensis*, *W. soli*, *W. cibaria*, *W. koreensis*, *W. ghanensis*, *W. beninenses*, *W. fabaria*, *W. ceti*, *W. fabalis*, *W.*

oryzae, *W. diestrammenae*, *W. uvarum*, *W. cryptocerci*, *W. bombi*, *W. jogaejeotgali*, *W. muntiaci*, e *W. sagaensis*

A literatura indica que tem um intervalo de temperatura de crescimento que pode ir de 15°C a 45°C com uma temperatura ótima de crescimento entre 20 e 30°C (Garvie, 1967).

Bacteriocinas produzidas por *Weissella* são raras (Björkroth K. J, 2002) (Fang, 2006) e têm a sua principal origem em *W. paramesenteroides*, *W. confusa*, *W. helénica* ou *W. cibaria*. Desta última a weissellicina 110 é das mais estudadas (Srionnual S, 2007).

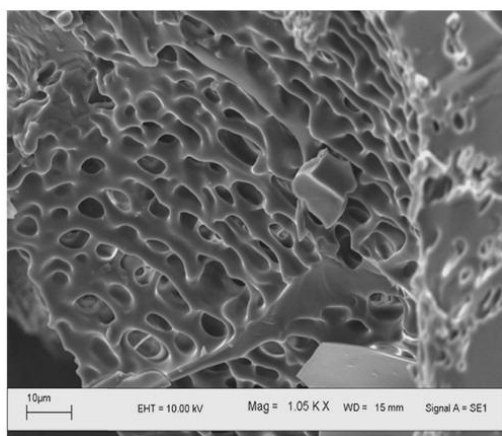


Figura 14: Dextrano de *Weissella cibaria* observação MET (Tingirikari, 2014)

As espécies *Weissella confusa* e *Weissella cibaria* são as principais produtoras de exopolissacarídeos (EPS) com propriedades funcionais, a maior parte sendo homopolissacarídeos (HoPS) como o dextrano (figura 14), o frutano, o galactano, o levano e a inulina por exemplo (Björkroth K. J, 2002) (Lee J-S, 2002).

Quanto às propriedades probióticas, as *Weissella* são conhecidas pela sua capacidade de resistir aos sucos do trato gastrointestinal como o ácido, a biliar, enzimas digestivas (Liu C. A., 2024). No entanto, não são ainda reconhecidas como GRAS por razões de segurança relacionadas com resistências a antibióticos, fatores de virulência (Fhoula, 2022) ou risco infeccioso oportunista (Apostolakos, 2022). No entanto, estudos recentes mostram que algumas estirpes, principalmente de *Weissella cibaria*, conseguem ultrapassar as avaliações de segurança (Tian, 2025; Kang M.S, 2019).

A descoberta de estirpes funcionais de *Weissella* é limitada e os estudos microbiológicos quase inexistentes.

Embora tenha necessidades nutricionais complexas, a *Weissella* pode ser encontrada em vários ecossistemas (tabela 1) e consegue assim fazer parte da microbiota de várias matérias-primas e estar presente em muitos alimentos. Podem ser provenientes do solo (Magnusson J., 2002), água de lago (Yanagida,

2007), plantas (tomates, laranja, bagas, papaia, cenoura, rizosfera das oliveiras, cachos uvas...), excreções humanas, leite e pele de animais saudáveis e principalmente de vários alimentos fermentados como queijos de leite cru, leite fermentado, vegetais e enchidos (Fusco Vincenzina, 2015).

Tabela 1: *Weissella* em diferentes ecossistemas (Fusco Vincenzina, 2015)

Species	Habitat or source	Reference
<i>W. cibaria</i>	Orange, pineapple, banana	Endo, <i>et al.</i> , 2009
	Tomato	Di Cagno, <i>et al.</i> , 2009
	Wheat flour	Alfonzo, <i>et al.</i> , 2013
	Blackberry, papaya	Di Cagno, Minervini, Rizzello, De Angelis & Gobbetti, 2011
<i>W. confuse</i>	Rhizosphere of the olive trees and surrounding soil	Fhoula <i>et al.</i> , 2013
	Red and yellow raw pepper	Di Cagno, <i>et al.</i> , 2009
<i>W. halotolerans</i>	Rhizosphere of the olive trees and surrounding soil	Alfonzo, <i>et al.</i> , 2013
	Fermented sausage	Tenea & Lara, 2019
<i>W. hellenica</i>	Vegetable forage crops	Tohno, Kobayashi, Nomura, Uegaki & Cai, 2012
	Croatian cheese fermented from raw milk	Fuka, <i>et al.</i> , 2013
<i>W. kandleri</i>	Desert plants	Holzapel & Van Wyk, 1982
<i>W. uvarum</i>	Wine grapes	Nisiotou, <i>et al.</i> , 2014
<i>W. sagaensis</i>	Chinese yogurt	Li, <i>et al.</i> , 2020
<i>W. paramesenteroides</i>	Raw milk cheeses	Masoud, <i>et al.</i> , 2012
	Fermented sausage	Juárez-Castelán, <i>et al.</i> , 2019

3.2.2. *Weissella cibaria*

Foi descrita pela primeira vez por Björkroth (Björkroth K. J, 2002) e posteriormente encontrada em vários alimentos fermentados tradicionais como fermento natural de trigo (De Vuyst, 2002), a morcela de Burgos (Santos, 2005), o kimchii (Kang, 2016) ou o Tarhana (Sengun, 2009).



Figura 15: *Weissella cibaria* numa matriz de EPS - Fonte: Gerado por IA (Gemini, Google 2026)

(Björkroth K. J, 2002) descreveu-a como uma Gram-positiva, cocobacilos em pares (figura 15), sem mobilidade. Catalase negativa, não cresce a 4°C, mas pode crescer a 45°C. *W.cibaria* difere das outras espécies de *Weissella* por ser capaz de

crescer a temperaturas de 45°C (Björkroth K. J, 2002). Heterofermentativa com produção de CO₂ a partir da glucose, *W.cibaria* produz poucos ácidos orgânicos. Pode produzir grandes quantidades de EPS a partir da sacarose, que se traduz pela produção de um gel. Fermenta a arabinose, a glucose, frutose, maltose, manose, sacarose e xilose, mas não fermenta a lactose. Crescem geralmente em meios com concentração de NaCl até 6,5%. *W.cibaria* destaca-se igualmente pela diferença na estrutura da ponte interpeptídica do peptidoglicano em relação às outras *Weissella* (mesmo com a *W. confusa* que lhe é muito próxima) (Björkroth K. J, 2002) apresentando um peptidoglicano de tipo A3 α , L-Lys-L-Ala(L-Ser)-L-Ala.

NB: A espécie *W. kimchii* isolada e descrita por (Hak-Jong Choi, 2002) a partir de vegetais fermentados coreanos (Kimchii) era do ponto de vista filogenético muito próxima de *W. cibaria*. Através da sequenciação 16S rDNA e da hibridação DNA-DNA foram ambas consideradas como sendo semelhantes e reclassificada como *W.cibaria* (Ennahar, 2004)

3.3. Algumas possíveis aplicações de *Weissella*

O género *Weissella*, como muitas LAB, tem um grande potencial para aplicações em géneros alimentícios.

- Contra patogénicos, como por exemplo *Listeria monocytogenes* (Kariyawasam, 2019; Fernandes, et al., 2017; Guerreiro, 2014) ou *Helicobacter pylori* (Nam H, 2002), através da produção de bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogénio (Fusco Vincenzina, 2015; Zacharof & Lovitt, 2012; Carvalho, 2015).
- Como antioxidante. O EPS produzido por certas estirpes de *Weissella* tem fortes propriedades antioxidante e pode ser uma alternativa comercial ao ácido ascórbico. (A.T. Adesulu-Dahunsi, 2018)
- Como probióticos pela capacidade, demonstrada em pelo menos oito estudos, de resistir a sais biliares, serem tolerantes a pH baixos, e sobrevivendo aos fluidos gastrointestinais. No entanto, essa capacidade varia entre estirpes e apresenta limitação na taxa de sobrevivência, principalmente sob condições simuladas (Teixeira CG B. Y.-D., 2024).
- Principalmente pela capacidade de produzir grandes quantidades de EPS em meios de cultura contendo sacarose. (Weerapong Woraprayote, 2018)

Esses polímeros podem ser adicionados a alimentos pelas suas propriedades espessantes, gelificantes e emulsionantes. Compostos com essas características são fundamentais nas formulações da indústria alimentar. Para além disso os EPS também podem ser considerados como fibras alimentares solúveis. Com sua baixa digestibilidade, comparado com a inulina comercial (Teixeira CG F. A., 2021), tem uma grande eficácia como pré-biótico. Também pode ser usado para melhorar a textura dos alimentos e reduzir a sinérese (perda de líquido a partir duma matriz coloidal) (Lakra AK, 2020). Pode substituir o amido de milho nos pudins e cremes ou melhorar a textura do pão sem glúten. Pelo seu alto peso molecular podem também agir como crio preservadores da integridade das proteínas em processos de congelação como alimentos contendo farinhas de trigo com glúten (Xiaojuan Tang, 2019)

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Microrganismos usados e regeneração das células

Foram selecionadas para o estudo 8 estirpes de *Weissella cibaria* (Tabela 2) da coleção da Unidade de Microbiologia Aplicada (UMA) conservadas em meio MRSB (*MAN, ROGOSA and SHARPE Broth*; Biokar Diagnostics; Beauvais, França) com 20 % de glicerol (Fisher Chemicals; Pittsburgh, Pensilvânia, EUA) à temperatura de -80 °C (Arca congeladora vertical Panasonic MDF-U55V; Tokyo; Japão). Foi verificado a pureza de acordo com os procedimentos descritos e normalizados (ISO 7218:2024) de cada uma delas em meio **WMAG** (*Weissella Medium Agar Glucose*), meio otimizado para o género (Ricciardi A., 2009). Após incubação a 37 °C 24 h (Estufa Sanyo MIR-262, Japão) foram verificadas algumas das suas características fenotípicas como a coloração de Gram, o teste da catalase e a análise morfológica das células por microscopia ótica (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japão).

Tentou-se resgatar as estirpes que não apresentaram pureza microbiológica (cultura mista) satisfatória por identificação por sequenciação pelo método de Sanger. Extraíu-se o DNA de cada uma delas por fervura em tampão TE (Tris EDTA) e amplificação PCR-RT (CFX96; Biorad; Hercules, Califórnia, EUA) com o protocolo de 5 min 95 °C; 45 ciclos 20 s 95 °C, 20 s 55 °C, 90 s 72 °C; 10 min

72 °C e com os primers 27F (5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') e 1492R (5' - TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3'), seguida de purificação do Amplicon com o kit NZYGelpure (NZYTECH; Lisboa, Portugal) e quantificação no Qubit™ 3 Quantitation (Invitrogene; Carlsbad, Califórnia, EUA).

Foi feita a repicagem duma colónia isolada pura de *Weissella cibaria* para meio WMBG (*Weissella Medium Broth Glucose*) e a incubação a 37 °C durante 24 h. Após uma centrifugação a 5000 g 2 min (Mikro20; Hettich; Alemanha), foi eliminado parte do WMBG e ao restante foi adicionado glicerol (Fisher Chemicals; Pittsburgh, Pensilvânia, EUA) estéril até uma concentração final de 20 % (V/V). Guardaram-se alíquotas à temperatura de -20 °C (Cultura Stock de trabalho), para a realização de todos os ensaios, e a -80 °C para a reposição na coleção do laboratório.

As estirpes de *Weissella* são provenientes da caracterização microbiana de amostras de leite de ovelha, cardo, coalhada e queijo duma produção de Queijo da Serra DOP. Foram pré-identificadas a partir de isolados por sequenciação do gene 16SrDNA (Rocha, 2023).

Tabela 2: Estirpes de *Weissella spp* da coleção da UMA

Codificação	Gênero	Espécie	Origem	Amostra	método identificação	Proveniência
PFM1501	<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	Coalhada	Queijo da Serra	Sequenciação Sanger	Coleção UMA
PFM1660	<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	Cardo	Queijo da Serra	Sequenciação Sanger	Coleção UMA
PFM1679	<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	Coalhada	Queijo da Serra	Sequenciação Sanger	Coleção UMA
PFM1703	<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	Queijo	Queijo da Serra	Sequenciação Sanger	Coleção UMA
PFM1852	<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	Cardo	Queijo da Serra	Sequenciação Sanger	Coleção UMA
PFM1861	<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	Coalhada	Queijo da Serra	Sequenciação Sanger	Coleção UMA
PFM1862	<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	Coalhada	Queijo da Serra	Sequenciação Sanger	Coleção UMA
PFM1863	<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	Coalhada	Queijo da Serra	Sequenciação Sanger	Coleção UMA

2. Meios de cultura usados

A preparação, controlo e armazenamento dos meios de cultura usados no trabalho foram realizados de acordo com a norma ISO11133:2014/Amd2020 (ISO 11133:2014/Amd2: 2020)

Os ensaios foram realizados a partir de culturas de trabalho (-20 °C), recuperadas em WMBG ou WMAG e com incubação a 37 °C durante 24 h.

Foram testados vários meios de cultura (compostos ou Comerciais) para *Weissella*: Man Rogosa and Sharp Agar/Broth (MRSA; VWR/Advantor,

Pensilvânia, EUA) / MRSB; Biokar Diagnostics; Beauvais, França), Agar Nutritivo (AN, Biokar Diagnostics; Beauvais, França), Triptona Soja Agar (TSA; Liofilchem; Düren, Alemanha), Mueller-Hinton (MH; Himedia; Honeywell; Charlotte, EUA) e os meios elaborados para *Weissella* WMAG/WMBG 2 % (Ricciardi A., 2009) cuja composição consiste em 0,5% (m/V) de triptona (Biokar Diagnostics; Beauvais, França), 0,75 % (m/V) de extrato de levedura (Biokar Diagnostics; Beauvais, França), 0,1 % (m/V) de di-hidrogenofosfato de potássio heptahidratado (Riedel; Seelze, Alemanha), 0,5 % (m/V) de acetato de sódio (Scharlau Chemie; Sentmenat, Barcelona, Espanha), 0,5 % (m/V) de citrato de sódio (Merck; Burlington, Massachusetts, EUA / Darmstadt, Alemanha), 0,05 % (V/V) de Tween 80 (Prolabo BDH; Fontenay-sous-Bois, França), 0,002 % (m/V) de Sulfato de magnésio heptahidratado (Merck; Burlington, Massachusetts, EUA / Darmstadt, Alemanha), 0,0005 % (m/V) de Sulfato de manganês monohidratado (Scharlau Chemie; Sentmenat, Barcelona, Espanha) e **1,6 % (m/V) de Agar** (Biokar Diagnostics; Beauvais, França) para o meio **WMAG**. Após autoclavagem a 121 °C durante 15 min é adicionado uma solução de glucose a 20% (m/V) (Scharlau Chemie; Sentmenat, Barcelona, Espanha) previamente esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm de maneira a obter uma concentração final de 2 % (m/V).

3. Condições de cultura usadas

3.1. Efeito da fonte de carbono e da temperatura, no crescimento

Ao meio WMB (*Weissella* Medium Broth sem açúcar) foram adicionadas várias fontes de carbono para uma concentração final de 2 % (m/V). Para estes ensaios foram usados a D(+)-glucose monohidratada (Scharlau Chemie; Sentmenat, Barcelona, Espanha), a Maltose monohidratada (Merck; Burlington, Massachusetts, EUA / Darmstadt, Alemanha), a D(+)-Manose (Sigma Aldrich/Merck; St. Louis, Missouri, EUA), D(+)-Sacarose (Fischer Chemical; Waltham, Massachusetts, EUA), a Lactose monohidratada (Prolabo/VWR; Fontenay-sous-Bois, França) e a Trealose (technical grade; Sosa; Navarcles, Barcelona, Espanha).

Os ensaios foram realizados em microplacas transparentes estéreis de 96 poços de fundo liso (F-Bottom) com anéis de condensação (Greiner Bio-One; Kremsmünster, Áustria).

O inóculo foi preparado a partir de culturas frescas em fase exponencial de crescimento, puras, provenientes de WMAG, em Peptona Sal 0,1 % (m/V) (Maximum Recovery Diluent; Merck; Burlington, Massachusetts, EUA / Darmstadt, Alemanha) numa concentração de 1 McFarland (correspondente a cerca de 3.0×10^8 UFC/mL para LAB com menos de 24 h (Sagar Aryal, 2025)). Após diluições até uma concentração de 10^5 UFC/mL em PS 0,1 % (m/V), foi inoculado 10 µL para cada 190 µL de meio WMB colocado no poço.

A placa foi incubada diretamente no espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan Skyhigh touch (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts; EUA) com leitura da Absorvância (DO $\lambda = 600$ nm) a cada 30 min e agitação prévia de 8 s a gestão do ensaio foi realizada pelo software Skanit Microplate Reader v.6.1.1.7 (Thermo Scientific; Waltham, Massachusetts; EUA).

Foram testadas temperaturas de incubação de 22°C, 30°C e 37°C até 24h para as 7 estirpes de *Weissella cibaria*. Todos os testes foram realizados em triplicado.

Para cada estirpe e para cada temperatura foi calculada a taxa de crescimento (h^{-1}) na base da fórmula usada na secção 3.3

3.2. Efeito do pH no crescimento

Foi realizado um *screening* prévio da capacidade de crescimento dentro duma gama de pH de 2,44 a 8,67 num meio WMBG em tubo ajustado com HCl 1M (Prolabo BDH; Fontenay-sous-Bois, França) e NaOH 3 M (LabChem; Zelienople, Pensilvânia, EUA) com o potenciómetro (Orion 4 Star; ThermoScientifics Waltham; USA). A ausência de turvação do meio de cultura inoculado no fim de 24 h de incubação a 37 °C, indicou uma incapacidade de crescimento da estirpe ao pH referido.

Dos resultados preliminares foram seleccionadas, para o estudo de crescimento, gamas de pH de 4 a 9 (tabela 3) para testes em microplaca de 96 poços, com o método semelhante ao usado para a fonte de carbono (secção 3.1).

Tabela 3: pH testados com *Weissella*

	pH							
Antes autoclavagem	4,00	4,96	5,52	5,97	6,55*	7,04	7,96	8,99
Depois autoclavagem	4,02	4,96	5,54	5,99	6,52	6,96	7,65	8,73

*sem ajuste

3.3. Curva padrão de crescimento (DO vs UFC) e taxa de crescimento

Para a elaboração da curva padrão efetuou-se diluições com WMBG duma suspensão de células das estirpes PFM1501 e PFM1679, em duplicado, de maneira a obter 5 valores de DO ($\lambda=600\text{nm}$) no espectrofotómetro UV-VIS (THERMO SCIENTIFIC Multiskan Skyhigh touch, USA) compreendidos entre 0,1 e 0,8.

Calculou-se a taxa de crescimento de cada estirpe a partir de dois pontos experimentais da fase exponencial de crescimento. Considerou-se a média como taxa de crescimento aproximada das *Weissella* em estudo

Fórmula:
$$\mu_{max} = \frac{\ln N2 - \ln N1}{\Delta t}$$

N2: concentração de células no tempo t2 (fim da fase exponencial)

N1: concentração de células no tempo t1 (início da fase exponencial)

Δt : tempo decorrido entre as duas medições

Calculou-se igualmente o tempo de geração (t_g).

$$t_g = \ln 2 / \mu_{max}$$

4. Caraterização bioquímica dos isolados

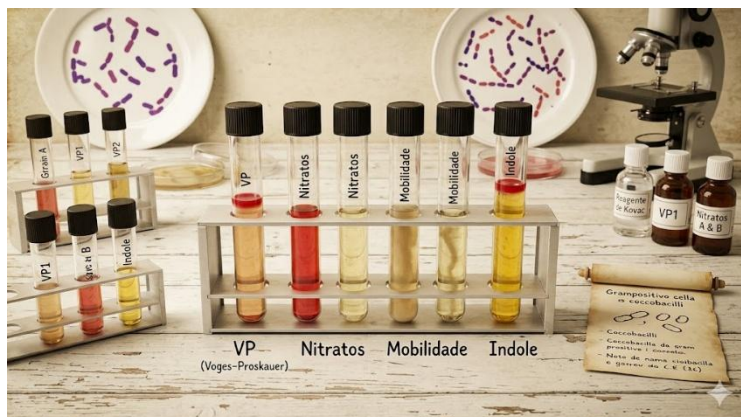


Figura 16: Testes bioquímicos - Fonte: Gerado por IA (Gemini, Google 2026)

Determinou-se o perfil fenotípico por testes bioquímicos: coloração de Gram e da catalase (indicadores de LAB), da motilidade e da nitrato redutase em meio Nitrate Motility Agar (NMA; CondaLab; Madris, Espanha), da produção de Indole em meio Tryptophan Broth (TB; Biokar Diagnostics; Beauvais, França) que indica a presença duma triptofanase que degrada o aminoácido triptofano em índole e que, quando reage com o reagente de Kovacks (Merck; Darmstadt, Alemanha), gera um anel de cor vermelha (figura 16).

Com o teste de Vosges-Proskauer VP em meio MethyRed Vosges-Proskauer (MRVP; Liofilchem; Düren, Alemanha) pretendeu-se identificar a fermentação da glucose a 37°C pela via butilenoglicólica com produção de acetoína (acetil-metil-carbinol). Este último composto na presença de Hidróxido de Potássio 40% (m/V) (KOH; Pronolab; Santo Domingo de Guzmán, República Dominicana) transforma-se em diacetilo e após adição de solução alcoólica de alfa-naftol 0,5% (m/V) (Merck; Darmstadt, Alemanha) em etanol 100 % (Applichem Panreac; Barcelona, Espanha/ Darmstadt, Alemanha) ocorre uma catálise com produção de um anel vermelho característico que indica resultado positivo (MacFaddin, 1981). (figura 16)

Determinou-se a produção de amílase pela hidrólise do amido em meio de Agar Nutritivo (AN; BiokarDiagnostics; Beauvais, França) com amido solúvel 0,5 % final (m/V) (Merck; Darmstadt, Alemanha). Após crescimento de 24 h a 37 °C, um resultado positivo traduz-se, na presença de lugol (solução iodo), no

aparecimento duma zona transparente à volta da estirpe. Um resultado negativo traduz-se por uma coloração roxa do agar devido à presença de amido.

Avaliou-se a produção de protease no meio WMAG com caseína de soro bovino 2 % (m/V) final. Após crescimento até 48 h a 37 °C, um resultado positivo traduz-se pelo aparecimento duma zona de precipitado branco à volta das colónias resultante da hidrólise da caseína em aminoácidos menos solúveis no meio.

Determinou-se a atividade lipolítica no meio WMAG com óleo de coco 1 % (m/V) final (óleo de uso alimentar) e tween 80 a 1,06 % (m/V) (Prolabo/VWR; Paris, França) para facilitar a emulsão. Após crescimento até 48h a 37°C, um resultado positivo traduz-se por uma zona de hidrólise à volta das colónias.

A produção de urease foi determinada no meio Urea Agar Base Christensen ISO 6785 (UA; VWR/Avantor, Pensilvânia, EUA) suplementado com ureia a 40 % (VWR/Avantor, Pensilvânia, EUA). Essa enzima hidrolisa a ureia provocando a alcalinização do meio que toma uma cor rosa-choque caraterístico, após crescimento 24 h a 37 °C.

A prova da lecitinase foi determinada em meio AN com gema de ovo 5 % (Oxoid; Hampshire, Reino Unido). Essa enzima hidrolisa a lecitina produzindo uma zona opaca branca (compostos insolúveis) ao redor das colónias, após crescimento 24 h a 37 °C.

A Lisina Descarboxilase (LDB; Oxoid; Hampshire, Reino Unido) cujo teste dá positivo (cor roxa) quando ocorre alcalização do meio por hidrólise da lisina em putrescina, após crescimento 24 h a 37 °C. A sua presença nas LAB é um indicador de virulência.

Determinou-se a atividade da fosfatase ácida, uma hidrolase que catalisa grupos fosfatos de moléculas orgânicas como esteres fosfóricos em pH ácidos (4,5-6,0) libertando fosfatos inorgânicos. Preparou-se extemporaneamente o reagente fosfatase ácida de acordo com a norma ISO 15213-2 anexo B4, adicionando α -naftil fosfato monossódico 2 % (m/V) (Acros Organics; Geel, Bélgica) e Fast Blue B Salt 4 % (m/V) (Sigma; St. Louis, Missouri, EUA) ao tampão de acetato pH 4,6. O tampão acetato foi preparado dissolvendo 0,3 mL de ácido acético glacial e 0,4 g de acetato de sódio em 1000 ml de água desionizada.

Para a sua determinação, num papel filtro tipo Whatman realizou-se o esfregaço de colónias provenientes duma cultura fresca em meio sólido (WMAG). Colou-se uma gota de reagente fosfatase ácida na colónia, que reage na presença de fosfatase, resultando no aparecimento duma cor roxa-escura intensa (libertação da fenoltaleína) em 3 a 4 min.

5. Capacidade de produção de compostos funcionais

5.1. Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

Aplicou-se o método de triagem rápida (*screening*) descrito por (Barrett, 2007) para analisar as capacidades de produção de ácido linoleico conjugado de culturas bacterianas.

Ao meio de cultura WMBG pH 7.0, adicionou-se ácido linoleico livre (LA; Acros Organics; Geel, Belgica) a 0,5 mg/mL (em etanol puro) e Tween 80 a 2 % (m/V) (Prolabo/VWR; Paris, França). Inoculou-se o meio com a estirpe em teste e incubou-se a 37 °C até 48 h. 1 mL da cultura foi centrifugada a 20000 g durante 1 min (Mikro 20, Hettich; Alemanha). Ao sobrenadante acrescentou-se 2 mL de isopropanol (Biochem Chemopharma; Cosne-Cours-sur-Loire, França), vortexou-se e aguardou-se 3min. Os ácidos gordos foram extraídos adicionando 1,5 mL de hexano (Honeywell; Charlotte, Carolina do Norte, EUA), agitando a solução e deixando em repouso 3 min. Mediu-se a absorvância $\lambda=233$ nm por espectrofotometria (ThermoScientifics; Multiskan Skyhigh touch; Whaltham; USA) da fase solúvel no hexano.

Quantificou-se o CLA através da elaboração da curva padrão de CLA (Naturmil 1000 mg) em hexano de maneira a obter concentrações indo de 0 a 160 mg, relacionando a absorvância com a concentração.

5.2. Produção de antioxidantes

Para a determinação da atividade antioxidante recorreu-se a métodos espectrofotométricos que avaliam diferentes mecanismos químicos como a transferência de eletrões (ET), de átomos de hidrogénio (HAT) ou a quantificação de compostos redutores como compostos fenólicos, por exemplo.

5.2.1. Preparação prévia das Amostras

A partir duma cultura das estirpes em WMBG a 37 °C *overnight*, foram obtidos os CFS (isentos de células) por centrifugação a 8000 g durante 5 min (Gyrozen

1536; Coreia do Sul), seguida duma filtração em membrana de 0,45µm (Avantor/VWR; Pensilvânia, EUA).

Da mesma cultura procedeu-se à centrifugação de 1mL e efetuou-se a lavagem do *pellet* (células) em PBS pH 7,2. A lise dessas células foi realizada pelo método da homogeneização com esferas (BeadsBug™; Benchmark Scientific; Sayreville, EUA) de maneira a podermos avaliar da atividade do conteúdo intracelular das células bacterianas.

Finalmente realizou-se a análise da atividade antioxidante do EPS purificado de cada estirpe produtora.

5.2.2. Métodos de análise

A atividade antioxidante foi determinada pelos seguintes métodos:

- **ABTS** (mecanismo de ET) que mede a atividade de eliminação de radicais ABTS (2,2-Azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (Roberta Re, 1999). À uma solução de ABTS (7mM) (Sigma; St Louis, Missouri, EUA) é adicionado (1:1) uma solução de Persulfato de Sódio 2,45 mM (Honeywell; Charlotte, Carolina do Norte, EUA) oxidando-a a ABTS+. Resulta uma cor verde-escura. A presença de antioxidantes reduz o ABTS+ provocando a descoloração da solução (fica incolor). A solução de ABTS/Persulfato Sódio (ABTS+) foi preparada e armazenada a temperatura ambiente por 16-18h num local escuro. Efetuou-se uma diluição dessa solução com metanol até conseguir uma DO ($\lambda=735\text{nm}$) de $0,7\pm0.05$. Numa microplaca 96 poços de fundo liso, colocou-se 25 µL de amostra e adicionou-se 200 µL de ABTS+. Depois de uma incubação de 6 min no escuro, mediu-se a absorvância ($\lambda=735\text{nm}$) no espectrofotómetro Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (ThermoScientific, Vantaa, Finland). O zero é realizado com metanol enquanto o branco (controlo) é feito com meio WMBG+ABTS. As amostras foram analisadas em triplicado. Para a quantificação foi realizada uma curva de calibração com Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; Tokyo Chemical Industry Co LTD; Tokyo, Japão) sendo os resultados expressos em mg/ml de equivalentes de Trolox (TEAC) ou em % de inibição do radical ABTS+ que representa a capacidade de neutralizar radicais livres. Quando maior a percentagem, maior a eficácia e a

concentração de antioxidantes presentes na amostra analisada. A atividade em %ABTS:

$$ABTS + (\%) = 100 - \frac{DO_{amostra} - DO_{controle}}{DO_{controle}} \times 100$$

O TEAC é calculado a partir da equação da reta da curva padrão realizada com Trolox.

- **DPPH** (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine) (mecanismo de HAT) que mede a capacidade de neutralizar o radical livre DPPH que, na presença de antioxidante (dadora de hidrogénio), muda a cor de roxo em solução metanólica para amarelo, apresentando um máximo de absorvância a 520 nm. É um método baseado no procedimento de (W. Brand-Williams, 1995) modificado por (Shi, 2019). Numa microplaca 96 poços de fundo liso, colocou-se 50 µL de amostra a 200 µL duma solução extemporânea de DPPH 60 µM (Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) em metanol, mantida no escuro por 30 min. Realizou-se a leitura da absorvancia a $\lambda=520$ nm no espectrofotómetro Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (ThermoScientific, Vantaa, Finland). O zero foi realizado com metanol e o branco com WMBG+DPPH. As amostras foram analisadas em triplicado. Para a quantificação foi realizada uma curva de calibração com Trolox e os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox (TEAC). A atividade é dada pela fórmula:

$$DPPH (\%) = \frac{DO \text{ branco} - DO \text{ amostra}}{DO \text{ branco}} \times 100$$

- **Compostos Fenólicos totais (TPC).** A determinação foi efetuada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu a partir do procedimento descrito por Rahmanian (Rahmanian, 2014). O reagente de Folin-Ciocalteu (Applichem Panreac; Darmstadt, Alemanha / Barcelona, Espanha), que contém ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, apresenta em meio alcalino uma cor transparente que passa para azul, na presença

de compostos fenólicos, com um máximo de absorvância a 765 nm. Num tubo Eppendorff de 1,5 mL, a 100 µL de amostra adicionou-se 200 µL de reagente Folin-Ciocalteu 0,2M e homogeneizou-se a mistura. Adicionou-se 800 µL de Carbonato de sódio 7 % (m/V) (Na₂CO₃; ChemLab; Zedelgem, Bélgica) e aguardou-se reação no escuro no mínimo 2 h a temperatura ambiente. Para a leitura no espectrofotómetro, transferiu-se 200 µL da solução para um poço numa placa 96 poços de fundo liso. A presença de TPC foi medida por espectrofotometria a $\lambda=765$ nm no espectrofotómetro Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (ThermoScientific, Vantaa, Finland) (Singleton, 1965) (Luís M. Magalhães, 2008). Para quantificação foi realizada uma curva de calibração com ácido gálico (Acros Organics; Geel, Bélgica) e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE). As amostras foram analisadas em triplicado e atividade foi dada pela fórmula:

$$mg\ GAE/g\ amostra = \frac{((DO_{amostra} - b)/m \times Fd) \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{m\ amostra} \times V$$

5.3. **Produção de diacetilo**

Foi determinada a capacidade de produção de diacetilo, de acordo com o método de Barrit (de Moraes, 2017). Usaram-se 4 meios para testar a produção de diacetilo:

- Meio SCM (Skimmed Cow Milk) composto de leite de vaca magro em pó a 1 % (w/v) (Molico; Nestlé, Vevey, Suíça) autoclavado durante 15 min a 110 °C
- Meio SCM autoclavado durante 15 min a 110 °C e posteriormente suplementado com citrato 0,1 % (m/V) (Merck; Darmstadt, Alemanha) esterilizado por filtração 0,45 µm
- Leite de vaca UHT magro (Mimosa; Porto, Portugal)
- Leite de vaca UHT magro (Mimosa) suplementado com citrato 0,1 % (m/V) esterilizado por filtração 0,45 µm

A 10 mL de meio foram adicionados 50 µL dum inóculo de cultura *overnight* 37 °C em WMBG. Após incubação a 30 °C durante 24 h em aerobiose e com

agitações frequentes, a 5mL de cultura foram adicionados 2,5 mL de solução de alfa-naftol 0,5 % (m/V) (Merck; ref.106223) em etanol absoluto 5 mL numa solução alcalina de creatina-KOH (KOH 40 % m/V, Labchem; Zelienople, Pensilvânia, EUA; creatina 0,3 % m/V; Fluka; Buchs, Suíça). Agitamos durante 30 s de 10 em 10 min até perfazer 30 min. O aparecimento dum anel rosado no topo indica um resultado positivo. Como controlo positivo foi usado 50 mL de SCM 1% (m/V) com 50 µL de diacetilo (Sigma; St. Louis, Missouri, EUA).

5.4. Atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana seguiu o método descrito por (Fernandes, et al., 2017) de *spot-on-lawn* em meio de Mueller-Hinton (Himedia; Mumbai, Índia) com glucose 2 % final (V/V) (Scharlau Chemie; Sentmenat, Barcelona, Espanha), inoculado com a estirpe alvo por espalhamento com zaragatoa numa cultura numa concentração final de 10^6 UFC/mL. Foram testados spots de 10 µL de cada estirpe de *Weissella* (e da B391) contra as estirpes indicadas na tabela seguinte (tabela 4):

Tabela 4: Estirpes alvo na pesquisa da atividade antimicrobiana

Género	espécie	Referencia
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	(NCTC10320),
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	(NCTC11143),
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	(NCTC12903),
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	(NCTC10527),
<i>Listeria</i>	<i>ivanovii</i>	(NCTC11846)
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	(NCTC12241)
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	(NCTC775)
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	(NCTC12981)
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> ssp <i>enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	(ATCC13076 / 25928)
<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>	(ATCC11741)
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	(estirpe selvagem UMA B232)
<i>Clostridium</i>	<i>perfringens</i>	(NCTC8237)
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	(NCTC10716)
<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	(estirpe selvagem UMA MATA233)
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	(ATCC10231).
<i>Penicillium</i> *	<i>spp</i>	(estirpe selvagem UMA MATA232)
<i>Botrytis</i> *	<i>cinerea</i>	(ATCC12481)
<i>Cladosporium</i> *	<i>spp</i>	(estirpe selvagem UMA MATA237)

*Incubação 37 °C com humidade até observação de crescimento suficiente (1 a 10 dias).

* Incubação 25 °C com humidade até observação de crescimento suficiente (1 a 10 dias).

Nota: A temperatura de crescimento de *B.cinerea* deve estar entre 18-25 °C para haver crescimento em ambiente com alguma humidade.

Foi usado *L. plantarum* B391 como controlo de produção de bacteriocina (identificada anteriormente como plantaricina), apresentada como termorresistente até 121 °C e estável a 4 °C, de natureza proteica (peso molecular de 6kDa), ativa (no CFS) contra 31 de 36 estirpes selvagens de *Listeria monocytogenes*, contra *L.ivanovii* (NCTC) e *L.innocua* (NCTC), assim como contra *Enterococcus faecalis* (NCTC 775) e *Clostridium perfringens* (NCTC 13170) (Fernandes, et al., 2017; Loureiro, 2015).

Testes adicionais. Sempre que se observou uma atividade antimicrobiana, mas não resultante do CFS, foram realizados os seguintes ensaios.

- Realizaram-se ensaios de indução por co-cultura (*Weissella* + *Listeria monocytogenes*) em WMBG, com inóculo inicial de 10⁴ UFC/mL de ambas as estirpes, de acordo com o método de (Maldonado-Barragán, 2013). O CFS de *Weissella/Listeria* foi aplicado por *spot-on-law* contra a *Listeria monocytogenes* a 10⁶ UFC/mL, segundo o método já descrito anteriormente.

- Realizaram-se ensaios de indução por metabolitos produzidos pelo microrganismo alvo. Obteve-se o CFS da *Listeria monocytogenes* incubada 24 h a 37 °C no meio TSEYB, composto pelo meio Triptone Soy Broth 3 % m/V (TSB; Biokar Diagnostics; Beauvais, França) e complementado com extrato de levedura 0,6 % m/V (Biokar Diagnostics; Beauvais, França). Após neutralização do pH, adicionou-se esse CFS ao meio WMBG, procedendo-se de seguida à inoculação com a estirpe de *Weissella* e à incubação a 37 °C *Overnight*. O CFS resultante desta 2ª incubação foi aplicado pelo método de *spot-on-law* contra *Listeria monocytogenes* a 10⁶ UFC/mL de maneira a verificar uma possível indução da secreção de bacteriocina no CFS das *Weissella*.

5.5. Produção de EPS

5.5.1. Screening inicial

Foi usado um método rápido para detetar as estirpes produtoras de EPS, determinada pela presença de um crescimento mucoide num meio sólido suplementado com sacarose 6% (Quattrini, 2020) .

Após crescimento prévio em WMBG *overnight* 37°C e centrifugação a 10000 g 4 °C durante 10 min, as células foram ressuspensas em PBS pH 7,2 e inoculadas por estria num meio WMAS6 composto por meio WMA (WMAG sem glucose –

secção 2) com 6 % final (V/V) de sacarose (Fisher Chemicals; Waltham, Massachusetts, EUA), WMAS2 (WMA com 2 % final (V/V) de sacarose) e WMAG. Após incubação 37 °C até 48 h verificou-se a presença de colónias mucoides.

5.5.2. Produção de EPS

Das estirpes produtoras selecionadas de acordo com o *screening* efetuado (secção 5.5.1), isolou-se e purificou-se os EPS produzidos em meios WMBS6 (líquido) e WMAS6 (sólido), pelo método de precipitação com álcool (Yu Y. J., 2018). Seguiu-se etapas de purificação. O método consistiu nos seguintes passos.

- A partir de produção de EPS em meio líquido: inoculou-se 1 mL duma cultura *overnight* 37°C em WMBG em 9 mL de WMBS6 (Zhou B., 2024).
- A partir de produção de EPS em meio sólido: a partir duma cultura *overnight* 37°C em WMBG inoculamos uma placa de WMAS6 e WMAS2 com uma ansa de 10 µL por esgotamento.

Na estufa refrigerada e programável (Panasonic MIR-154-PE, Japão) incubaram-se as placas WMAS6 e WMAS2 e os tubos WMBS6 a 37 °C durante 15 h, até à fase estacionária, e de seguida a 25 °C durante 48h para produção de EPS.

Os tubos foram centrifugados a 10000 g durante 30 min a 4 °C (Centrífuga Gyrozen 1536, Coreia do Sul) e recuperou-se o sobrenadante (cerca de 10 mL). As placas (superfície) foram lavadas com 10mL duma solução tampão de PBS pH 7 e recolheu-se a amostra. Centrifugou-se a 10000 g durante 30 min a 4 °C e recuperou-se o sobrenadante (cerca de 10 mL).

Aos 10 mL de amostra adicionou-se 30 mL (1:3) de etanol 95 % frio (-20 °C) (Etanol absoluto, Applichem Panreac; Darmstadt, Alemanha). Deixou-se precipitar a 4 °C *overnight*. Após centrifugar 10000 g durante 30 min a 4 °C, o sobrenadante foi eliminado e o resto de etanol foi evaporado a 50 °C durante 1 a 2 h ou em estufa a 37 °C *overnight*.

O *pellet* (precipitado) foi de seguida reidratado com 4 mL de ácido tricloroacético 10 % (m/V) (TCA, Applichem Panreac; Darmstadt, Alemanha), para precipitar as proteínas, e colocado a 4 °C *overnight*.

Etapa suplementar: para amostras constituídas por altas concentrações de EPS foi realizada um pre-tratamento da mesma pelo Método de Sevag (Thuy, 2018; Li, 2019): Aos 4 mL de *pellet* com TCA, adicionou-se 6 mL de água estéril desionizada para fluidificar a amostra. Neutralizou-se o pH com NaOH 3M e adicionou-se 4 volumes duma mistura de clorofórmio/1-butanol (4:1) (clorofórmio; AnalaR Normapur/VWR; Radnor, Pensilvânia, EUA; 1-butanol; Merck; Darmstadt, Alemanha) a 1 volume de amostra. Homogeneizou-se cerca de 20 min num agitador orbital Certomat S (Braun Biotech International/Sartorius; Alemanha). Depois de separar as fases por centrifugação a 5000 rpm durante 10 min, recuperou-se cuidadosamente a fase aquosa (superior), repetindo (de 2 a 5 vezes) até a interface entre as fases ficar límpida (sem proteínas). Recuperar a amostra (<10 mL).

A seguir a uma centrifugação a 10000 g durante 30 min a 4 °C, recuperou-se o sobrenadante (~4mL de amostra) e voltou-se a precipitar o EPS com 3 volumes de etanol 95% frio por volume de amostra. Colocou-se a 4 °C *overnight*. Novamente centrifugou-se a 10000 g durante 30 min a 4 °C e eliminou-se o sobrenadante. Deixou-se secar o etanol em estufa 37°C *overnight* ou 1h em estufa de 50 °C. O *pellet* foi ressuspenso com 2 a 5 mL (consoante a quantidade de EPS obtida) de água estéril desionizada. Obteve-se o *Crude-EPS* (C-EPS). As fases seguintes de purificação envolveu uma primeira etapa de dialise com o sistema Slide-A-Lyser Mini Dialysis Devices MWCO 3,5 kDa (Thermo Scientific; Vantaa, Finland). Obteve-se o *Dialysed-EPS* (D-EPS). Numa segunda etapa de purificação o D-EPS foi passado por uma coluna Vivaspin 500 (MWCO 100kDa; Sartorius; Göttingen, Alemanha). Após eliminação do eluente obteve-se o EPS purificado (P-EPS) que foi liofilizado num liofilizador vertical de bancada com Bomba (MARTIN CHRIST Alpha 1-2 LD Plus, Alemanha) e guardado num exsiccador. As amostras foram pesadas para avaliar das estirpes com maior produção.

5.5.3. Efeito *quorum sensing* (QS)

De maneira a identificar mecanismos de indução de produção de EPS, ou de estimulação *via* stress metabólico (esgotamento de nutrientes, densidade celular), as culturas de *Weissella* (produtora de EPS) foram cultivadas em WMBG *overnight* a 37°C. Após centrifugação e duas lavagens das células em

PBS, foram inoculadas placas de WMAS6 (niveladas e com os mesmos 20 mL de meio) segundo esquema seguinte (figura 17)

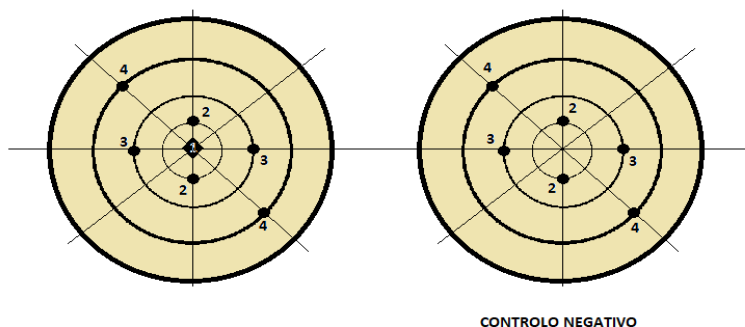


Figura 17: teste de quorum sensing em WMAS 6%

Ponto 1: 10 μ L de inóculo (10^9 UFC/mL) correspondente ao ponto central de alta densidade celular, potencial fonte de QS. A placa de WMAS6 foi incubada a 37 °C durante 2 h antes da aplicação dos outros *spots* para estabelecer um gradiente químico inicial.

Pontos 2; 3; 4: 2 μ L de inóculo (10^3 UFC/mL) correspondente aos pontos de menor densidade celular, deslocados em forma helicoidal em relação ao centro e situados a distâncias crescentes (10, 20 e 30 mm respetivamente em relação ao centro). A inoculação foi feita em duplicado.

Uma segunda placa foi inoculada sem o ponto central (indutor) servindo de controlo negativo e foi incubada 2 h antes da aplicação dos pontos 2, 3 e 4.

Após incubação de 15 h a 37 °C, seguidas de 48 h a 25 °C, fez-se uma leitura fenotípica das colónias baseada na apreciação do aspeto seco/mucoso/*ropy* (formação de fios) e viscosidade. (Wongsuphachat, 2010).

Um teste adicional do estudo da influência da concentração de células na produção de EPS foi realizado inoculando em WMAS6 de 2 μ L de células de 7 diluições decimais decrescentes (de 10^8 a 0 UFC/mL) em PS foi realizado de maneira a verificar o efeito da densidade celular na produção de EPS.

5.5.4. Determinação da composição do EPS

A composição do EPS foi determinada recorrendo ao método de cromatografia em camada fina (TLC) dum hidrolisado de EPS, através de placas de alumínio revestidas com sílica gel 60 (Merck, Darmstadt, Alemanha) e sensibilizadas por

aplicação numa solução de Cu (II) a 0,5% (m/V) (CUSO₄.7H₂O, Merck; Darmstadt, Alemanha).

Em 500 µL de água estéril desionizada foi solubilizada uma pequena quantidade de P-EPS (secção 5.5.2). Em água desionizada, prepararam-se padrões de monossacarídeos na concentração de 0,5 % (m/V), de D(+)-glucose (Biochem Chemopharma; Montréal, Canadá), D(+)-galactose (Acros-Organics; Geel, Bélgica), D(-)-frutose (Merck; Darmstadt, Alemanha), L(+)-ramnose monohidratada (TCI; Tóquio, Japão) D(+)-xilose (Fisher BioReagents; Waltham, Massachusetts, EUA), D-arabinose (Sigma; St. Louis, Missouri, EUA) e L-fucose (Sigma; St. Louis, Missouri, EUA). Como controlo da hidrólise usou-se uma solução de amido solúvel a 0,5 % (m/V) (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Procedeu-se à hidrólise ácida usando 1 volume de ácido trifluoroacético 2M (TFA; Acros Organics; Geel, Bélgica) para 1 volume de amostra (P-EPS, padrões ou controlo). Com o auxílio do termobloco com aquecimento de cobertura (Maxigene; Stuart Scientific; Staffordshire, Reino Unido), a amostra foi submetida a uma temperatura de 100 °C durante 3 h, tempo otimizado para um EPS de origem bacteriana (Peter Albersheim, 1967). Ao longo do processo de hidrólise, efetuou-se a agitação dos tubos a cada 30 min. Guardou-se o hidrolisado a 4 °C.

2 µL dos hidrolisados foram aplicados na base da placa de TLC, tendo-se aumentado o número de aplicações da amostra de P-EPS quando se verificou a necessidade em aumentar a quantidade.

Usou-se um solvente de migração constituído pela mistura de acetato de etilo (ApplichemPanreac; Darmstadt, Alemanha), ácido acético glacial (ApplichemPanreac; Darmstadt, Alemanha), 1-propanol (LabScan Analytical Sciences; Dublin, Irlanda) e água, nas proporções 4:2:2:1. A cromatografia realizou-se numa câmara hermética saturada de solvente, durante 2 h. A revelação final foi obtida pela vaporização numa solução de permanganato de potássio 0,5 % (m/V) (KMnO₄; Merck; Darmstadt, Alemanha) em NaOH 100 mM (LabChem; Zelienople, Pensilvânia, EUA) onde os açúcares foram revelados pela cor amarela em fundo roxo após secagem.

A identificação do(s) monossacarídeo(s) foi feita por comparação com os padrões usados na mesma cromatografia. O amido, usado como referência, deve apresentar um único sinal correspondente à glucose.

O resultado da amostra de EPS da estirpe PFM1679 foi posteriormente confirmado por espectroscopia Fourier-Transform InfraRed (FT-IR) (Nicolet IS5; ThermoScientific; Whaltham; USA) com sistema ID7 ATR (ThermoScientific; Whaltham; USA), a partir dos produtos da cromatografia após recolha dos *spots* da sílica, previamente purificados, liofilizados e conservados no exsiccador.

Realizou-se uma análise por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC; UltiMate3000; ThermoScientific; Whaltham; USA) com sistema de separação em coluna Sugar-Pak WAT085188 (Waters; Milford; USA) e detetor IR RefractoMax 520 (ThermoScientific; Whaltham; USA), numa amostra de EPS hidrolisado de PFM1679, neutralizada, purificada e filtrada (filtro seringa 0,45 µm). A coluna foi eluída com uma solução de cálcio de EDTA a 50 mg/L em água ultrapura estéril e desgasificada. E eluição foi realizada em modo isocrático, com um caudal de 0,5 mL/min. A temperatura de eluição da coluna foi de 85 °C.

6. Propriedades probióticas

Foram efetuados testes de resistência (pH, sais biliares, NaCl), testes de adesão (hidrofobicidade, autoagregação e coagregação), de atividade antimicrobiana e alguns testes de segurança (fatores de virulência)

6.1. Testes de adesão celular

6.1.1. Hidrofobicidade superficial das células

Este ensaio permite avaliar a propensão das bactérias (probióticos) em aderirem a superfícies hidrofóbicas e foi realizado de acordo com os métodos descritos na literatura (Kaushik JK, 2009; M. Rosenberg D. G., 1980; Vijendra Mishra, 2005).

Para este ensaio realizou-se um teste MATH (Microbial Adhesion to Hydrocarbons), usando um solvente apolar (xileno). A hidrofobicidade foi definida pela percentagem de células que migram para a fase orgânica hidrofóbica.

$$\text{hidrofobicidade superficial: (\%H)} = \frac{DO_{\text{inicial}} - DO_{\text{final}}}{DO_{\text{inicial}}} \times 100$$

6.1.2. Ensaios de autoagregação e coagregação

Estes ensaios são indicadores indiretos da capacidade de colonização e de barreira protetora das estirpes estudadas no trato gastrointestinal. O teste de autoagregação foi realizado de acordo com o método descrito por Kaushik (Kaushik JK, 2009)

Efetua-se uma suspensão de células em PBS (pH=7,2) cuja concentração correspondeu a uma absorvância de 0,5 a $\lambda=600$ nm. Após forte agitação foi colocada por 5 h a 37 °C sem agitação. A absorvância ($\lambda=600$ nm) foi medida ao tempo $t=0$ h (A_0); 1 h; 2 h e 5 h (A_t).

$$\% \text{ agg} = 1 - \frac{DO_t}{DO_{t=0}} \times 100$$

Para este ensaio a estirpe em estudo, assim como uma estirpe de *Escherichia coli* e *Salmonella entérica*, são ajustadas, após crescimento e lavagem em PBS (pH=7,2), a uma concentração de células em PBS (pH=7,2) correspondente a uma absorvância de 0,5 a $\lambda=600$ nm. Após forte agitação, é feito um teste de sedimentação de cada uma das 3 estirpes individualmente e misturadas com a estirpe alvo (*E.coli* ou *Salmonella*). A incubação é feita a temperatura ambiente durante 1 h sem agitação. A DO ($\lambda=600$ nm) é medida a $t=0$ (A_0); e 5 h (A_t).

$$\text{No tempo } t, \% \text{ coagg} = \left(\frac{\frac{C1 + C2}{2} - A}{\frac{C1 + C2}{2}} \right) \times 100^*$$

* (Handley PS, 1987)

C1: DO estirpe em estudo no fim de 5 horas

C2: DO estirpe alvo no fim de 5 horas

A: DO da mistura estirpe alvo e da estirpe em estudo (1:1) no fim de 5 horas

6.2. Testes de resistência aos sais biliares

Após lavagem em PBS pH 7 de células das estirpes de *Weissella* obtidas numa cultura *overnight* em WMBG, efetuou-se uma suspensão de células

correspondente ao padrão de 1,0 McFarland. Inoculou-se 50µL (1 % final) desse inóculo a 5 mL de WMBG (controle) e 5 mL WMBG com sais biliares 0,3 % (m/V) (Oxoid; Basingstoke, Reino Unido). Após 4h de incubação a 37 °C, efetuou-se a contagem das células viáveis por contagem de colônias em meio WMAG do tempo t=0 e do tempo t=4 h. Calculou-se a percentagem da taxa de sobrevivência (TS) em ambos os meios no fim de 4 h com a fórmula

$$TS\% = \frac{\log UFC/mL \text{ final}}{\log UFC/mL \text{ inicial}} \times 100$$

6.3. Testes de segurança - Fatores de virulência

As estirpes em estudo foram submetidas a ensaios para rastrear os fatores de virulência de acordo com (J. Barbosa, 2010)

6.3.1. Teste da produção de enzimas hidrolíticas

6.3.1.1. Gelatinase

A prova da gelatinase foi realizada pela inoculação numa colónia fresca da estirpe em teste crescida em WMAG, num meio gelatina lactosada (GL; CondaLab; Madrid, Espanha) e suplementado com glucose 2 % (m/V). Determinou-se a capacidade de produzir enzimas que vão degradar a gelatina (da qual é constituído o meio), após um crescimento de 24h a 37°C resultando na liquefação do meio mesmo após colocação de 1 h a 4 °C.

6.3.1.2. Lípase/atividade lipolítica

Determinou-se a presença da atividade de lípases pelo método descrito na secção 2.

6.3.1.3. DNase (Desoxirribonuclease)

A determinação da presença da atividade dessa enzima foi realizada em meio DNase test Agar (secção 2). Um resultado positivo é traduzido pelo aparecimento de zonas claras à volta das colónias após adição de ácido clorídrico 1 M.

6.3.2. Atividade hemolítica

O teste determina a capacidade de lisar os eritrócitos através da produção de hemolisinas que transforma a estirpe num patogénico oportunista.

Foi testada por sementeira da estirpe em estria com ansa de 10 µL, em fase de crescimento exponencial, em placas de Columbia Agar com 5 % sangue de ovelha (COS; Biomerieux; Marcy-l'Étoile, França) e incubação 37 °C até 48 h. *Bacillus cereus* (NCTC10320) é usado como controlo positivo com uma hemólise β (total) em redor da colónia.

6.3.3. Aminoácidos biogénicos:

Para este estudo foi usado o meio de Lisina Descarboxilase (LDB) (secção 2) por inoculação à superfície do caldo numa colónia fresca da estirpe crescida em WMAG.

6.4. Capacidade de Remoção do colesterol

A capacidade de remoção do colesterol foi determinada pelo método do o-phthalaldehyde (OPA; Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) (Liu C. A., 2025) com modificações e adaptações.

Para este ensaio, foi usado um meio de WMBG com sais biliares 0,3 % (m/V) (Oxoid; Basingstoke, Reino Unido) (Nami, 2019) e colesterol a 0,15 mg/mL final (Calbiochem; Darmstadt, Alemanha). Após inoculação de 10 mL de meio em tubo de vidro com tampa de rosca hermética e incubação a 37°C durante 24h em anaerobiose (Fhoula I, 2018), foi recuperado o sobrenadante da cultura por centrifugação a 10000 rpm durante 15 min. Após extração com n-hexano (Honeywell; Charlotte, Carolina do Norte, EUA), determinou-se a quantidade de colesterol residual usando o método colorimétrico rápido e sensível indicado por (L.L. Rudel, 1973). O colesterol reage com o OPA formando um complexo estável colorido cuja absorvância é lida no espectrofotómetro a λ=550 nm. A concentração é determinada com ajuda curva padrão de colesterol.

$$\%CR = 100 - \frac{Cf}{C0} \times 100$$

Cf: Colesterol quantificado na amostra

C0: Colesterol da amostra controlo (sem inoculo)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nota preliminar – Controlo da pureza: A estirpe **PFM1852** foi descartada do estudo por apresentar cultura mista. Na sua recuperação a partir do isolado a 80 °C apresentou dois tipos de colónias morfológicamente diferentes em WMAG. Os testes clássicos da coloração de Gram indicou para ambas cocobacilos Gram-positivos e o teste da catalase deu negativo. A identificação por sequenciação Sanger do gene 16S rDNA das duas estirpes presentes indicou tratar-se de *Weissella cibaria* em ambos os casos embora de estirpes diferentes.

1. Caraterização das condições de crescimento

1.1. Meios de cultura

As estirpes de *Weissella cibaria* cresceram em todos os meios testados, nomeadamente MRSA, MRSB, MH, AN, TSA, WMAG e WMBG.

Verificou-se que o meio com melhor produtividade (mais células, maior consistência das colónias) foi o meio **WMAG e WMBG**, o que era de esperar visto serem meios otimizados especificamente para a *Weissella* (Ricciardi A., 2009).

O MRSA/B também obteve um bom desempenho, mesmo se menor do que o WMAG. No entanto, estes meios comerciais têm elevadas concentrações de glucose (20 g/L) e fontes de azoto que, às altas temperaturas e tempos da autoclavagem, desencadeiam reações de Maillard resultando na formação de compostos escuros como a melanoidina (Echavarría, 2012). Estas podem originar perdas de nutrientes críticos, geração de compostos inibitórios (furfural por exemplo) ou alterações ligeiras do pH por formação de compostos ácidos. Essas ocorrências poderão ser explicadas pelos longos períodos de aquecimento e arrefecimento da autoclave, onde o meio fica demasiado tempo exposto a temperatura >100°C. Além disso, o meio comercial não permite flexibilidade pois não é possível remover a glucose para testar outras condições de culturas, pelo que não foi selecionado para a realização dos ensaios.

1.2. Fonte de carbono

Todas as estirpes de *Weissella cibaria* fermentaram a glucose, maltose, manose e sacarose o que reflete a capacidade das estirpes em usar fontes de carbono diversificadas. Não fermentaram a lactose e a trealose.

Entre os açúcares fermentados, verificou-se a melhor taxa de crescimento no meio de WMA com a fonte de carbono glucose a 2 % (final) para as 3 temperaturas (figura 18). Às temperaturas de 37 e 30 °C, as taxas calculadas foram de 0,59 e 0,56 h⁻¹ respetivamente, caindo para 0,24 h⁻¹ para a temperatura de 22 °C. A maltose teve desempenho idêntico à glucose para 37 °C mas a produtividade diminui com a temperatura (0,58 0,38 e 0,21h⁻¹ para 37 30 e 22°C respetivamente).

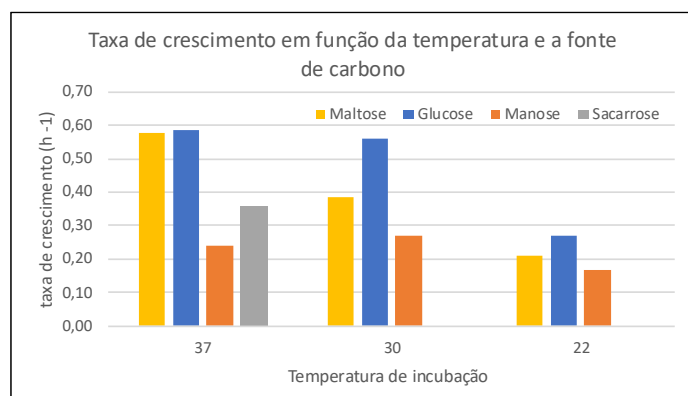


Figura 18: taxa de crescimento segundo a fonte de carbono e a temperatura de incubação

A sacarose só foi testada para uma temperatura de 37°C. No entanto, para esse açúcar, verificamos que a estirpe PFM1679 teve o melhor desempenho (melhor do que com a glucose) (figura 19) o que é um facto potencialmente significativo a favor da produção de EPS. Para a estirpe PFM1660 o desempenho foi pior com sacarose.

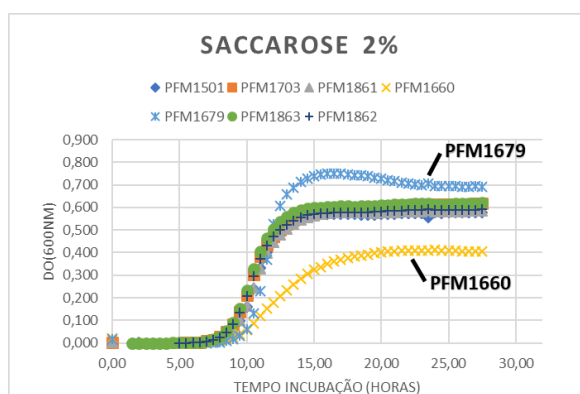


Figura 19: Crescimento em Sacarose 2%

Com a manose, a fase LAG é mais demorada (Figura 20), sendo de 6 h com glucose e de 15 h para a manose. Isso explica-se pelo facto da glucose ser a fonte de carbono preferencial para a maioria das LAB e que a utilização de outros açúcares secundários, como a manose, está sob controlo da Repressão Catabólica pelo Carbono (CCR) (Görke, 2008), principalmente quando o inóculo provém dum meio de pré-cultura com glucose, o que foi o caso (WMBG). A fase de adaptação para remover essa repressão consome tempo e energia celular prolongando a fase LAG.

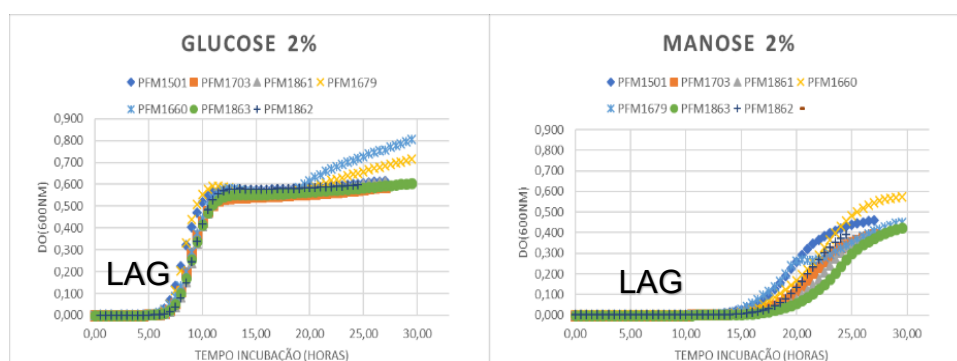


Figura 20: Curva de crescimento Glucose vs Manose

1.3. Temperatura

Para a mesma temperatura de 37 °C os níveis de crescimento obtidos com a maltose e a glucose são praticamente idênticas (figura 18). Em fisiologia bacteriana a glucose e a maltose partilham vias metabólicas de elevada eficiência como a glicólise, o que resulta em taxas de crescimento muito similares.

A maior taxa de crescimento para a glucose foi obtida para a temperatura de 37 °C (secção 1.2 resultados e discussão). Embora muitas LAB prefiram temperaturas de 30°C para seu catabolismo fermentativo, o maior crescimento a 37°C pode explicar-se pela própria fisiologia dessas estirpes. Estudos mostraram uma ampla tolerância térmica entre espécies de *Weissella* que podem variar de 15 °C para algumas e 42-45 °C para outras (Björkroth K. J, 2002).

Para 30°C, quando comparados com 37°C, as taxas de crescimento mantiveram-se para a glucose (0,59 contra 0,56 h⁻¹) até melhoraram para a manose (0,24 contra 0,27 h⁻¹), mas caiu para a maltose (0,58 contra 0,38h⁻¹).

Para a temperaturas de 22°C verificou-se uma grande queda na taxa de crescimento das estirpes de *Weissella* independentemente da fonte de carbono usada. Comparativamente com a temperatura de 37 °C, a produtividade caiu 64 % para a maltose, 54 % para a glucose e 30 % para a manose. Essa diminuição deve-se à desaceleração dos transportes celulares e à menor atividade enzimática derivada da temperatura.

1.4. pH e acidificação do meio

No primeiro *screening* efetuado entre pH de 2.4 e 8.67, verificou-se uma ausência de crescimento das *Weissella* abaixo de pH 4.02. Para o ensaio em microplacas, na gama selecionada (pH entre 4.0 e 9.0), as estirpes de *Weissella* têm sensibilidades e crescimentos diferentes consoante o pH considerado. Não crescem para valores de pH inferiores ou iguais a pH 4 (à semelhança do ensaio em tubo) e valores iguais ou superiores a pH 8.73.

Verificou-se que uma maior acidez do meio tem tendência para prolongar a fase LAG. Essa fase dura entre 7 a 8h quando o pH é de 6.55 e prolonga-se para cerca de 20 h quando o pH desce para 4.96 (Figura 21).

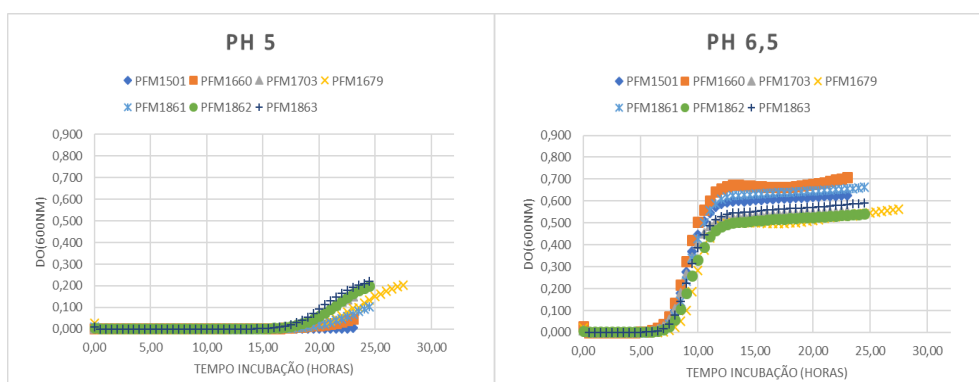


Figura 21: Influencia do pH no crescimento

Isso deve-se ao impacto direto da acidez na homeostasia celular, obrigando a *Weissella* (que é tolerante ao ácido) a um período de adaptação onde, durante as primeiras horas, a energia da célula é desviada da síntese de biomassa para a manutenção da homeostasia do pH (Siegumfeldt H, 2000).

A estirpe PFM1679 e PFM1660 têm os melhores desempenhos para pH mais elevados entre 6.96 e 7.65 (Figura 24). No entanto, PFM1679 apresenta um dos piores crescimentos para pH de 5.5 (figura 22).

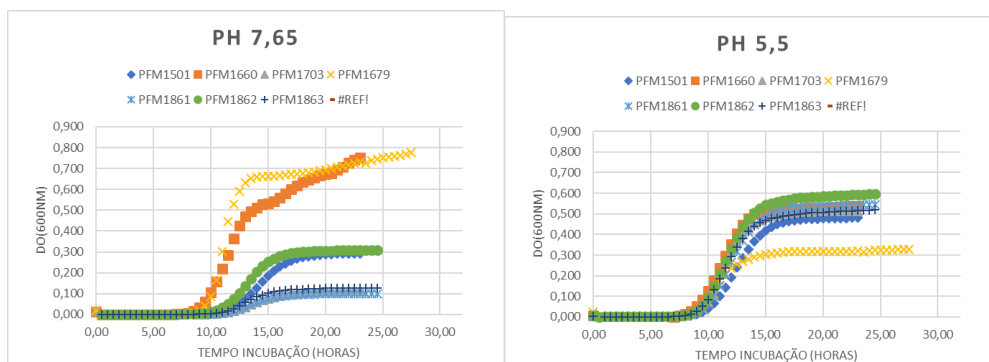


Figura 22: crescimento a pH 7,65 e a pH 5,5

A estirpe PFM1660 tem um espectro de tolerância ao pH mais amplo do que as outras estirpes testadas. Apresenta o melhor desempenho nas gamas alta de pH (até 8.73) mas igualmente nas gamas mais baixas (pH 5.5), o que lhe confere uma tolerância maior às variações de pH (figura 22).

As estirpes PFM1861 e PFM1863 são as estirpes de menor tolerância para pH elevados (pH 7,65) como se pode observa na figura 22.

1.5. Cinética de crescimento

A interpretação dessas constantes é fundamental para avaliar a eficiência metabólica e a aptidão competitiva das estirpes. Visto que as curvas de crescimento das *Weissella* (teste de temperatura e fonte de carbono) foram praticamente semelhantes para a temperatura de 37 °C e para um pH de 6.5, optou-se pela realização da curva de crescimento de duas das 7 estirpes (PFM1501 e PFM1679), num ensaio em duplicado, e extrapolando os resultados obtidos às outras estirpes de *Weissella* definindo a taxa de crescimento específica (μ_{max}) média obtida. O cálculo da taxa específica de crescimento (μ_{max}) média das estirpes de *Weissella cibaria* indicou um μ_{max} de 0,442 h⁻¹ (tabela 5).

Tabela 5: cálculo da taxa específica média de crescimento das *Weissella cibaria* PFM1501 e PFM1679

estirpes	taxa específica de crescimento (h ⁻¹)		
	PFM1501	PFM1679	média
μ_{max}	0,411	0,473	0,442

Isso indica que, durante a fase de crescimento exponencial, a população de estirpes de *Weissella cibaria* aumenta a sua biomassa em cerca de 44 % a cada hora. Segundo o guia de interpretação estatístico de (Allen RJ, 2018) podemos

considerar uma taxa moderada a rápida que é comum para bactérias em meio rico.

Cálculo do tempo de duplicação:

$$t_g = (\ln 2) / \mu_{\max}$$

$$t_g = \ln 2 / 0,442 = 94 \text{ min}$$

O número de células de *Weissella* duplica em média a cada 94 min na fase exponencial. Esses dados são importantes nos processos de fermentação em bioreatores porque permitem definir os tempos de permanência e a taxa de diluição ideal para maximizar a produtividade.

Em termos microbiológicos é um crescimento rápido que indica que as condições de cultura das *Weissella* estão perfeitamente adequadas a um crescimento eficiente. Num estudo (Quattrini, 2020), comparando 23 estirpes de *Weissella cibaria* e 7 de *Weissella confusa*, o autor determinou que, em condições otimizadas, o $\mu_{\max}$ pode atingir até $0,93 \text{ h}^{-1}$. Obteve-se um resultado inferior, mas, no entanto, o valor poderá indicar uma oportunidade para otimizar as condições de cultura das estirpes estudadas. Além disso, em termos comparativos gerais essa taxa mantém-se bastante competitiva. Um *Lactobacillus acidophilus* mostrou um $\mu_{\max}$ de $0,289 \text{ h}^{-1}$, um *Lactococcus lactis* um $\mu_{\max}$ de $0,100$ a $0,129 \text{ h}^{-1}$ e alguns *Lactobacillus casei* um $\mu_{\max}$ de entre $0,364$ e $0,473 \text{ h}^{-1}$ (Montes, 2024).

No entanto, o perfil funcional é muitas vezes mais valorizado do que a velocidade de crescimento (Quattrini, 2020) e esse valor não deve ser interpretado isoladamente pois, na perspectiva de uso biotecnológico, outros parâmetros podem incidir no rendimento como a taxa de acidificação ou a tolerância ao stress por exemplo.

2. Caraterização fenotípica

Tabela 6: Resultados dos testes fenotípicos

			Gram	catalase	Gelatinase	motilidade	NitratoRedutase	amilase	protease	Lipase	Indole	NaCl 5%	urease	lectinase	Difase test	lisina descarboxilase	vp	hemólise
PFM 1501	Weissella	cibaria	bG+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	γ
PFM1660	Weissella	cibaria	bG+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	γ
PFM1679	Weissella	cibaria	bG+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	γ
PFM1703	Weissella	cibaria	bG+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	γ
PFM1861	Weissella	cibaria	bG+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	γ
PFM1862	Weissella	cibaria	bG+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	γ
PFM1863	Weissella	cibaria	bG+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	γ
B391	Lactobacillus	plantarum	bG+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	γ
NCTC8237	Clostridium	perfringens	bG+		+													
NCTC12241	Escherichia	coli	bG-			+	+			+	-	-						
NCTC10320	Bacillus	cereus	bG+				+									+	β	
NCTC12981	Staphylococcus	aureus	cG+	+		-	-	+	-	-	+		+	+				α
NCTC10400	Bacillus	subtilis	bG+						+									
NCTC11938	Proteus	mirabilis	bG-									+						
ATCC15305	Staphylococcus	saprophyticus	cG+											-				
CC13076/25	Salmonella	enterica	bG-												+			
NCTC6272	Citrobacter	freundii	bG-												-			
NCTC11143	Bacillus	cereus	bG+				+									+	β	

Depois de validados os resultados pelos controlos positivos e controlos de esterilidade associado a cada meio de ensaio, verificou-se que todas as *Weissella cibaria* partilham o mesmo perfil fenotípico (tabela 6) no que diz respeito aos ensaios efetuados.

Como era de esperar, são bacilos gram-positivos (não esporulados), sem motilidade e catalase negativa. Esta é uma das principais caraterísticas das bactérias do ácido láctico (Collins MD, 1993).

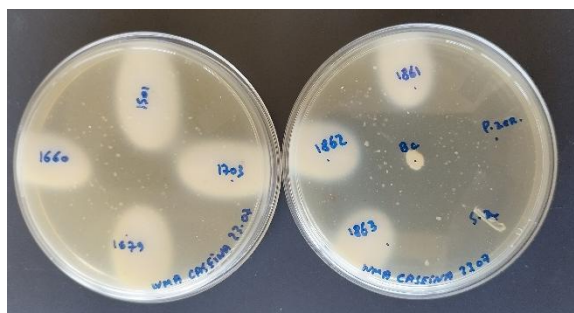


Figura 23: Teste protease em meio WMBA com caseína bovina (V. Monteiro)

As *Weissella cibaria* são positivas para presença de proteases (figura 23). O meio inicialmente transparente indica que as proteínas do soro (β -lactoglobulina, α -lactoalbumina...) estão solubilizadas no meio. Observou-se um forte precipitado

branco ao redor das colónias que aponta para a ação duma protease na degradação da caseína cuja atividade proteolítica se manifesta na presença de peptídeos que podem ser desnaturados localmente pelo pH ou outras enzimas. A proteólise parcial e a presença de aminoácidos ou peptídeos insolúveis originam um precipitado que pode ser interpretado como um resultado positivo de produção de proteases extracelulares. *Weissella cibaria* não é conhecida pela

sua produção de proteases (Zannini E. J., 2018) ao contrário de outras LAB como *Lactobacillus* ou *Enterococcus*. Um estudo realizado sobre 57 isolados de *Weissella* (Camila Gonçalves Teixeira, 2021) indicou apenas uma estirpe produtora de protease. As poucas estirpes produtoras citadas em artigos são quase sempre provenientes de matérias-primas relacionadas com laticínios.

Todos os outros testes deram resultados negativos para a nitrato-redutase, amilase, produção de índole, urease, lecitinase e o teste VP

3. Produção de metabolitos de interesse tecnológico

3.1. CLA

Os ensaios parecem indicar que as estirpes são produtoras de CLA. A estirpe PFM1679 foi a que teve a maior taxa de produção (6,72 mg/mL) (figura 24).

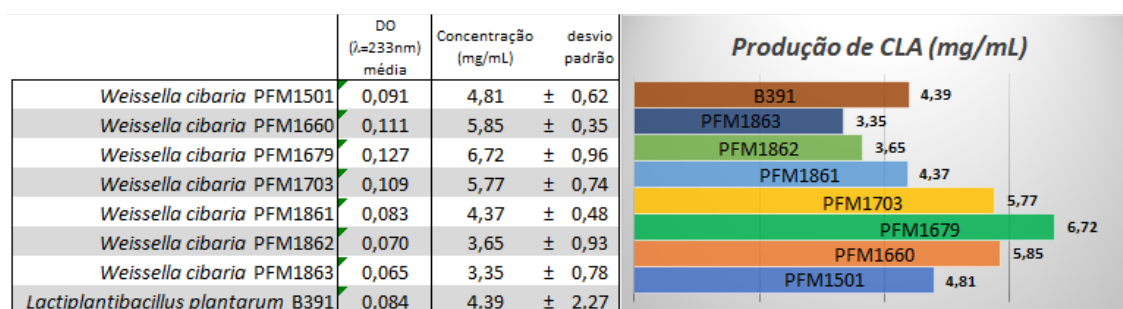


Figura 24: Produção de CLA pelas estirpes de *Weissella cibaria* e *Lactiplantibacillus plantarum*

No entanto, uma análise crítica dos resultados aponta para a possibilidade de falsos positivos. Com um LA original de 0,5 mg/mL, não seria possível obter valores de CLA de 6 mg/mL sem infringir a lei de conservação de massa. Possivelmente poderão existir compostos (com ligações duplas) a criar interferência, como proteínas residuais ou talvez componentes do próprio meio de cultura que absorvem a 233nm.

3.2. Diacetilo

Embora o leite de vaca contenha citrato na sua matriz, o processamento de desidratação do leite para obtenção do leite em pó (requerido para este teste) pode diminuir a sua concentração. Por isso foram usadas 2 matrizes base, o leite de vaca magro UHT e o leite em pó magro reconstituído (SCM). A cada uma delas foi adicionado citrato, com o objetivo da saturação intracelular de piruvato para otimizar o catabolismo do citrato pela *Weissella*. Em excesso, a via

homoláctica fica saturada (transformação de piruvato em acetato e lactato) fazendo com que o excesso seja convertido num precursor do diacetilo (H. Boumerdassi, 1997).

Não foi detetada a produção de diacetilo pelas estirpes de *Weissella*. No entanto, a produção de diacetilo parece estar relacionada com o pH. Num estudo com várias estirpes de *Leuconotoc mesenteroides* (Marina Levata-Jovanovic, 1996), verificou-se que, em leite, a produção de diacetilo tornou-se significativa após acidificação (pH 4 a 4,5). Outros estudos esclarecem que o pH altera não só a síntese, mas também o destino metabólico do diacetilo, mesmo se o efeito possa vir a variar de espécie para espécie (Cachon, 1994; Zuljan, 2014; Le Bars, 2008).

3.3. *Bacteriocinas*

Verificou-se uma ação antimicrobiana (Tabela 7) de todas as estirpes de *Weissella* contra *Listeria monocytogenes* (figura 25 E), *Listeria ivanovii*, *Bacillus cereus* NCTC11143 (estudada pela sua patogenicidade derivada da produção de enterotoxinas) (figura 25 B), *Bacillus cereus* ATCC11778 (estirpe de referência para controlos microbiológicos) (figura 25 A), *Penicillium* spp MATA232 (figura 25 D) e uma forte ação contra *Clostridium perfringens* (figura 25 C).



Figura 25: atividade antimicrobiana - produção de bacteriocina contra *Bacillus cereus* ATCC11778 (A) *B. cereus* NCTC11143 (B) *Clostridium perfringens* (C) *Penicillium* spp (D) *Listeria monocytogenes* (E)

As estirpes PFM1501, PFM1660, PFM1861 e PFM1862 também tiveram uma ação fraca contra *Pseudomonas aeruginosa*, podendo ser derivada da ação de ácidos orgânicos ou à ação da formação de biofilmes (EPS) que limitam o crescimento de *Pseudomonas* que é aeróbia estrita.

Em relação ao controlo usado *Lactiplantibacillus plantarum* B391, a ação da bacteriocina confirmou-se nas estirpes de *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* e *Clostridium perfringens*. (Fernandes, et al.,

2017). A ação é fraca nas estirpes de *Bacillus cereus* NCTC11143 e *Bacillus cereus* ATCC11778. Não teve ação nos fungos testados.

Tabela 7: Teste de inibição de antimicrobianos

estirpe	Referencia	Meio	L plantarum 8391	PFM 1501 (diâmetro halo de inibição em mm)	PFM 1660 (diâmetro halo de inibição em mm)	PFM 1679 (diâmetro halo de inibição em mm)	PFM 1703 (diâmetro halo de inibição em mm)	PFM 1861 (diâmetro halo de inibição em mm)	PFM 1862 (diâmetro halo de inibição em mm)	PFM 1863 (diâmetro halo de inibição em mm)
<i>Clostridium perfringens</i>	NCTC8237; ATCC13124	MH	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Listeria ivanovii</i>	NCTC11846; ATCC19119	MH	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>Listeria monocytogenes serovar 4b</i>	NCTC 11994	MH	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus salivarius</i>	ATCC11741	MH	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	NCTC11143	MH	W	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	NCTC10320	MH	W	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC12981; ATCC25923	MH	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	NCTC775; ATCC19433	MH	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica serovar Enteritidis</i>	ATCC13076/25928	MH	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	NCTC12241; ATCC25922	MH	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCTC12903; ATCC27853	MH	-	+	+	-	-	+	+	W
<i>Penicillium spp</i>	Ref#: MN634686.1 MATA0232	MH	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	Ref#: MT065682.1 MATA0233	MH	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NCTC10716; ATCC9763	MH	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	MH	-	-	-	-	-	-	-	-

W: weak

MH: meio Mueller Hinton

A possibilidade dum efeito de ação inibidora por produção de peróxido de hidrogénio é descartada pelo facto que as *Listeria* e os *Bacillus* serem fortes produtores de catalase. A inibição não se deve por isso (para esses microrganismos) ao H₂O₂. No entanto poderá ser confirmada por adição de uma catalase ao meio testado para eliminar possíveis peróxidos.

Para um efeito derivado da produção de ácidos orgânicos produzidos pelas LAB, a falta de inibição pelo CFS (que contem esses ácidos) poderá afastar essa hipótese. No entanto, não podemos descartar uma ação localizada à proximidade do organismo alvo. De notar que o meio de Mueller Hinton é um meio tamponado que deveria diminuir ou atenuar o efeito dos ácidos orgânicos, mesmo que tais ácidos não tenham grande impacto na *Listeria* por esta possuir mecanismos robustos de resposta ao stress (Li M, 2021).

Como era de esperar, para a B391 o CFS é ativo (controlo positivo) através da produção de plantaricina (Fernandes, et al., 2017).

A atividade antimicrobiana de todas as estirpes de *Weissella cibaria* só se verifica na presença de células vivas (figura 26 B e 26 C), enquanto o sobrenadante livre de células (CFS) permanece inativo (figura 26 A). Não se observou efeito inibidor do conteúdo intracelular das células (figura 26 D). Esses resultados sugerem que o mecanismo antimicrobiano para as *Weissella* não provém de compostos secretados livremente, nem de compostos presentes intracelularmente. É uma

ação aparentemente contato-dependente ou que requer proximidade ao patogénico.

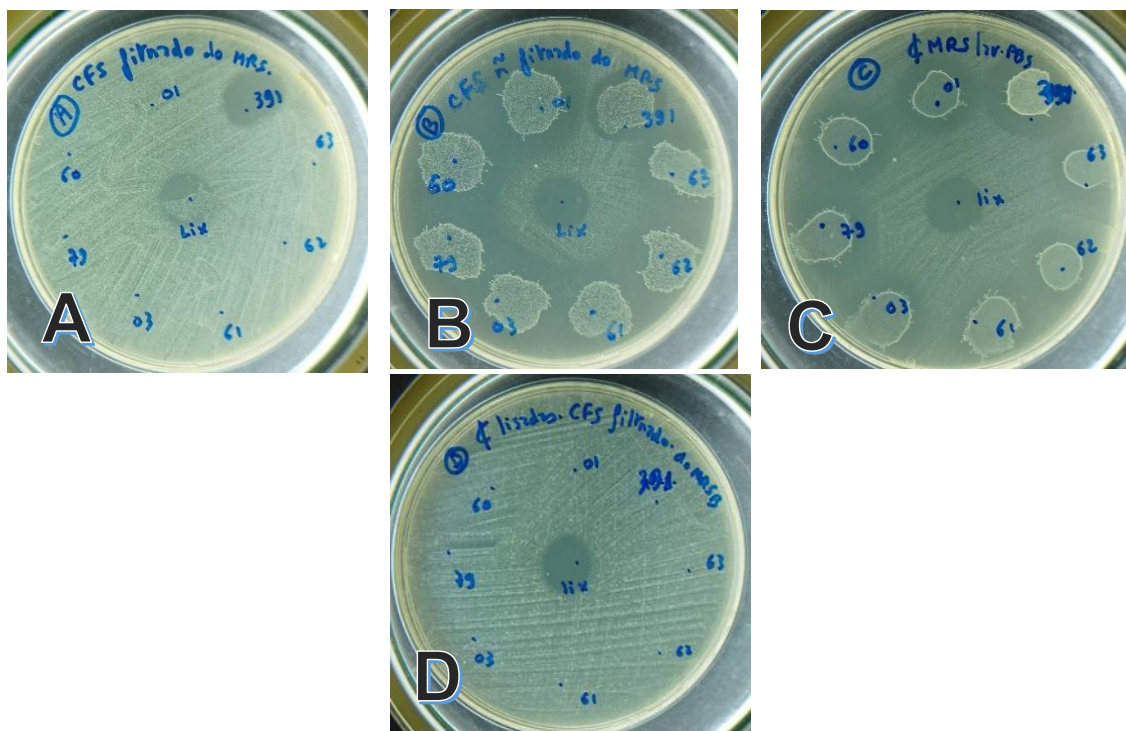


Figura 26: Ação antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*. Ação do CFS (A), das células não lavadas (B), das células lavadas em PBS (C), das células lisadas com o CFS (D)

Várias hipóteses podem ser avançadas:

- A inibição pode ter uma ação localizada célula-célula. Por exemplo a bacteriocina é produzida localmente perto do seu alvo enquanto no CFS, esta pode ser degradada por enzimas como proteases. Tendo em conta que as *Weissella* produzem proteases (secção 3 Resultados e Discussão), possivelmente podem estar na origem da degradação de bacteriocinas no CFS.
- A inibição é concentração dependente. A concentração de bacteriocina no CFS está abaixo da concentração mínima inibidora (CMI). Há estudos a apontar valores de CMI no CFS relativamente altas para produzir efeito contra *Listeria* (Rotta, 2025). No entanto, *in situ*, as células poderão produzir localmente concentrações suficientes na interface com o alvo para que haja ação antimicrobiana.
- A bacteriocina está associada à superfície das células. De maneira não covalente (adsorção) ou integrando a membrana celular (figura 27).

Muitas bacteriocinas, de origem peptídica, têm propriedades anfífilas e permanecem ligadas, pela sua parte hidrofóbica, de forma não covalente à parede celular característica das estirpes produtoras gram-positivas (Navarre WW, 1999). Na centrifugação para obtenção do CFS, o agente inibidor poderia assim ser removido conjuntamente com o *pellet* celular deixando o CFS inativo. A inibição só se verificaria na proximidade entre a *Weissella* e o seu alvo, onde o peptídeo poderá ser transferido e atuar.

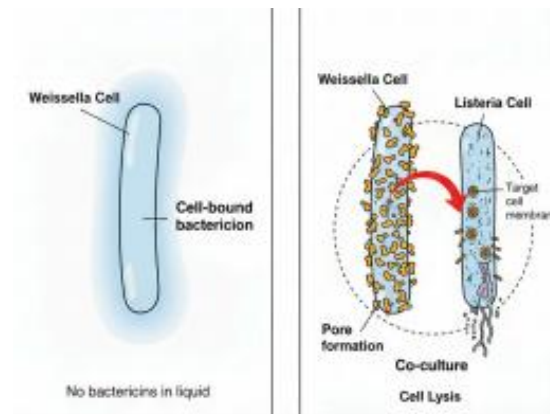


Figura 27: Bacteriocina ligada à superfície. Criado por IA (GPAI, 2026)

- **Efeito Quorum Sensing:** Muitas LAB não produzem bacteriocinas de maneira sistemática. Essa produção passa a ser regulada por um sistema (*quorum sensing*) que envolve um peptídeo de indução (IP), uma proteína quinase histidina (HPK) e um regulador de resposta (RR) (Monnet V, 2015). Na cultura em WMBG, a concentração do IP pode não atingir o limiar de ativação que pode despoletar a expressão dos genes que sintetizam a bacteriocina. Em ambos os testes de indução por co-cultura e de cultura induzida por metabolitos, não se observou inibição da *Listeria* (alvo) pelo CFS produzido, pelo que não houve secreção fruto da não indução do processo. Logo concluímos que, caso haja bacteriocinas, essas não são libertadas para o meio de cultura e por isso a inibição é independente da ativação de genes pelo contato com o alvo. De outro modo, estudos também indicam que alguns tipos de reguladores como os Tprs (transcriptase factor regulated by Phr peptide) podem ser inibidos, enquanto se verifica a disponibilidade de glucose, regulando assim a necessidade de produção de bacteriocina

(Hoover SE, 2015) que é principalmente uma ferramenta que limita a concorrência pelos nutrientes.

- É comum em bactérias Gram positivas as inibições dependerem do contato. Esses sistemas de inibição dependentes de contato (CDI) envolvem proteínas de grande tamanho na superfície celular que, após ligação física específica ao alvo, atuam na superfície do alvo. Como estão ligadas, não são libertadas para o meio e O CFS não apresenta atividade antimicrobiana. O mecanismo garante custos metabólicos menores em relação à produção de bacteriocinas secretadas diretamente para o CFS. Ora, no ensaio de separação de contato entre células (figura 26 E1 e E2) a barreira física não impediu a inibição o que confirma que é independente do contato célula-célula, mas que exige contiguidade para inibir.

De maneira a entender melhor o mecanismo de ação, mais testes deverão ser realizados como a remoção da parede celular de peptidoglicano (que eventualmente possa ter bacteriocinas associadas) para obter protoplastos, mantendo a integridade da sua membrana citoplasmática. Poder-se-á então testar pelo método de *spot-on-law*, a atividade antimicrobiana tanto dos metabolitos secretados pelos protoplastos, como da membrana removida que possa carregar os eventuais peptídeos responsáveis pela ação antimicrobiana.

O mecanismo de contato direto deve ser mais estudado. Tudo aponta para um antagonismo dependente de contato com a hipótese que o possível fator (bacteriocina) ser fraco, instável ou pouco concentrado para observar-se um efeito com o CFS. No entanto, estudos demonstraram que o CFS ativo de algumas estirpes de *Weissella* são muito dependentes da estirpe, do alvo e sobretudo das condições de cultura (Yeu, 2021; Liu C. A., 2024).

3.4. **EPS**

3.3.1. Produção

O teste de *screening* indicou que, à exceção da PFM1660 (figura 28), as *Weissella cibaria* são todas produtoras de EPS e em quantidade consequente. *Lactiplantibacillus plantarum* não é produtor de EPS (figura 28).

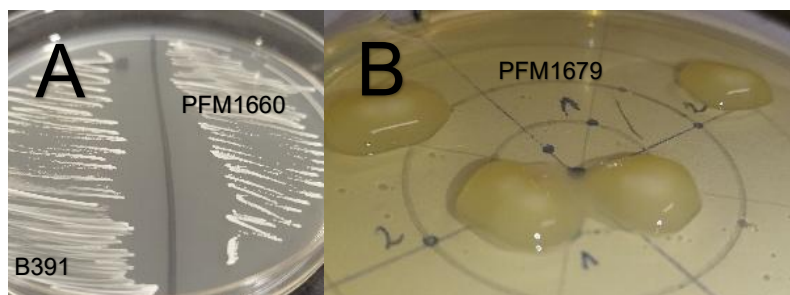


Figura 28: produção EPS em WMAS6 negativo para PFM1660 e B391 (A) e positiva para PFM1679 (B)

Apesar das limitações existentes para comparar os dois métodos, verificou-se que a produção em placa (meio sólido) é altamente superior à produção em caldo. Uma amostra de EPS produzido, purificado e liofilizado a partir de 10 mL WMBS6 (líquido) permitiu obter cerca de 1mg de produto liofilizado. Em WMAS6 (sólido) por esgotamento foram obtidos 8mg.

Na produção em placa a produção de EPS aparenta ser mais elevada (colónias fortemente mucoides) quando a sementeira é feita por esgotamento (figura 29 A) em comparação às placas inoculadas por *spread-plate* (figura 29 B) onde não parece haver produção aparente de EPS.

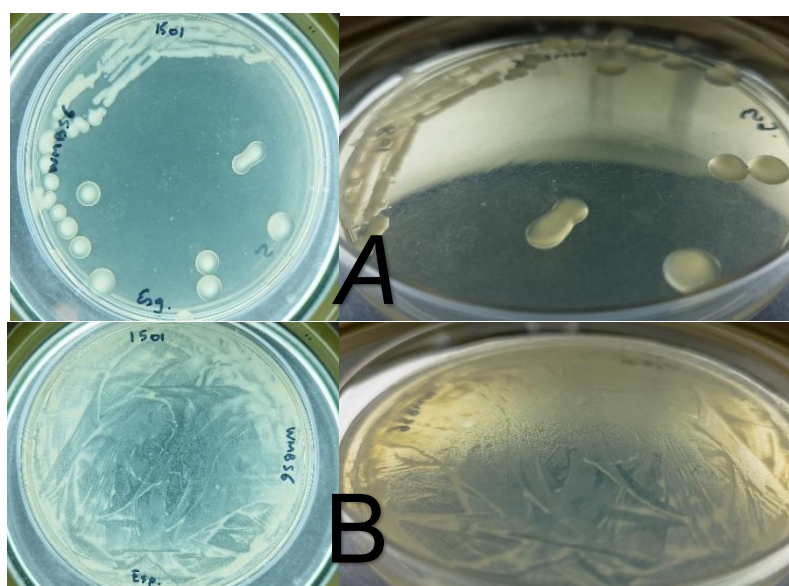


Figura 29: Efeito da densidade de células de *Weissella cibaria* PFM1501 na produção de EPS. Por esgotamento (A) e por espalhamento (B)

No caldo, a produção de biomassa é favorecida em detrimento da produção de EPS pelo facto do crescimento ser mais homogéneo e por os nutrientes estarem mais disponíveis. A fase exponencial de crescimento é assim mantida mais tempo o que diminui o rendimento de EPS, metabolito sintetizado já numa fase mais tardia por vias metabólicas secundárias. Nas placas, há limitação na

difusão de nutrientes e acumulação de metabolitos secundários que provocam um stress moderado que favorece a formação de biofilme (EPS) (Linton, 1991). “As taxas máximas de produção são favorecidas quando os fluxos de carbono e de energia estão integrados, e a alteração deste equilíbrio pode afetar negativamente as taxas de produção” (Linton, 1991). Numa projeção à escala industrial será importante definir e equacionar esse ponto de equilíbrio na maximização da produção de EPS.

Além disso, o meio WMAS com 6 % de sacarose obteve os maiores rendimentos comparados com WMAG 2 % e WMAS 2 % visto produzirem colónias muito mucoides (Figura 30). O maior rendimento de EPS no meio com sacarose 6% explica-se pelo facto que a sacarose é simultaneamente o substrato para o crescimento e o substrato direto para a síntese de EPS. O mesmo resultado foi obtido num estudo onde a adição de sacarose ao meio de MRS resultou numa produção 100 vezes maior de EPS por parte de *Weissella cibaria* 27 (Yu Y. J., 2018). Além disso, o EPS formado à volta da colónia é retido e a grande quantidade de sacarose (6 %) no agar difunde lentamente para a colónia alimentando o processo de síntese de EPS.

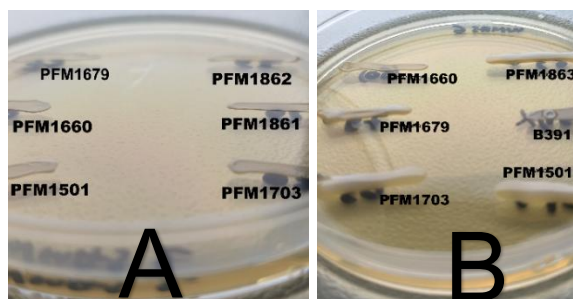


Figura 30: Screening produção de EPS em WMAS2 (A) e WMAS6 (B)

Verificou-se que a produção não é dependente do *quorum sensing* (QS). Pois não se verifica diferenças na quantidade de EPS produzido em placas com e sem ponto indutor (QS), nem variações nas quantidades observadas em relação à distância do ponto central (figura 31).

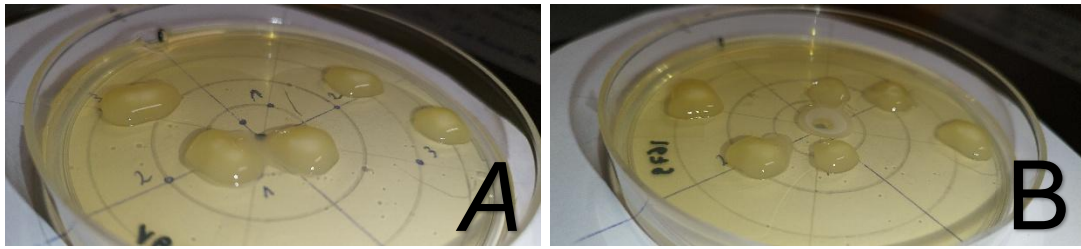


Figura 31: Teste de Quorum Sensing - Controlo negativo sem Indutor (A) e com inóculo (indutor) central de alta densidade potencial fonte de QS (B)

A maior produção de EPS no esgotamento em placa resulta muito provavelmente da menor densidade celular, de ambiente cultural mais favorável à atividade das glucansucrases (para sintetizar EPS) e duma menor acidificação local que não inibe a atividade enzimática.

No teste de verificação do efeito da densidade de células na produção de EPS (figura 32), verifica-se que em alta concentração (ponto 8: $>10^8$ UFC/mL) a quantidade de EPS é, comparativamente à quantidade de células presentes, muito menor do que a produzida por uma quantidade de células da ordem dos 10^3 UFC/mL (ponto 6). Observou-se que a produção parece inversamente proporcional à concentração de células. Testes quantitativos deverão ser realizados para confirmar o efeito da densidade de células no rendimento da produção de EPS.



Figura 32: Produção de EPS em placas vs concentrações decrescentes de células.

Testes adicionais, complementares ou confirmativos poderão ainda ser realizados em caldo WMBS6 em vez de meio sólido, já que em meio líquido os resultados serão mais facilmente projetados a escalas maiores como em bioreatores industriais.

Seria pertinente um estudo mais aprofundado de otimização da produção de EPS, nomeadamente a identificação das gamas de pH mais produtivas,

temperaturas e concentrações de sacarose ou tempos de incubação, fatores de stress (ácidos orgânicos, peróxidos...). Por exemplo, estudos indicam que os rendimentos de produção de EPS são otimizados, para a estirpe *Weissella cibaria* 27, para temperaturas de incubação de 22 °C 36 horas a pH 5,6 e concentrações de sacarose de 4% e de 22 °C 24 horas a pH 6,2 e concentrações de sacarose de 6 % (m/V) (Yu Y. J., 2018).

3.3.2. Determinação da composição do EPS

Pelo método de cromatografia em camada fina (TLC) e após hidrólise ácida com TFA 2 M, foram obtidos os perfis cromatográficos que foram comparados com monómeros sujeitos ao mesmo processo

Os EPS parecem ter todos o mesmo perfil onde a mancha cromatográfica principal é semelhante à glucose. Não se observou uma mancha nítida que possa coincidir com a frutose, descartando a possibilidade de ser um frutano. Logo, o EPS deverá ser composto essencialmente por monómeros de glucose (Figura 33) o que é típico dum homopolissacarídeo de glucano como o dextrano.

No entanto, podemos ter presença de manose, pois a mancha cromatográfica confunde-se com a de glucose. Não existindo resolução suficiente demonstrada para descartar esta hipótese. Neste caso teríamos um heterossacarídeo Glc-Man.

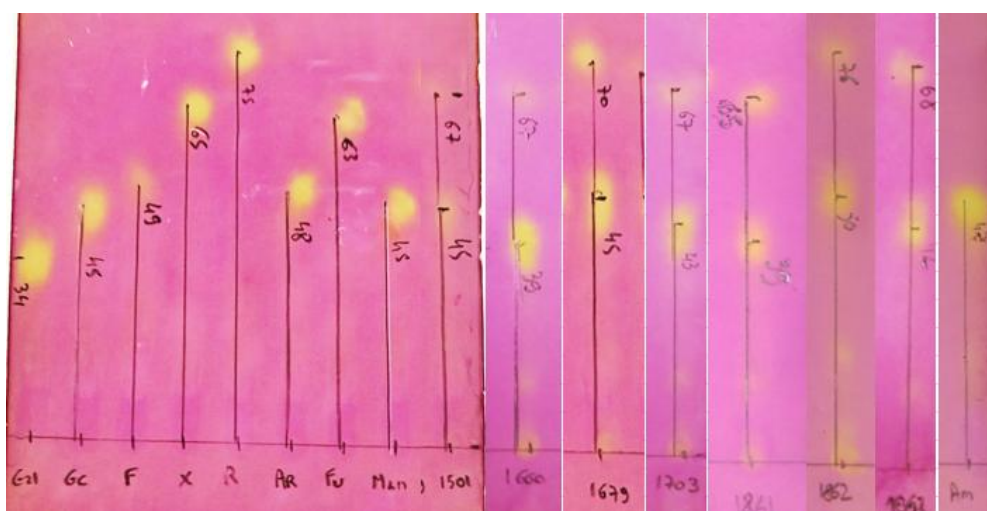


Figura 33: Determinação da composição em monossacarídeos do EPS das estirpes. (Gal: galactose; Gc: glucose; F: frutose; X: xilose; R: ramnose; Ar: arabinose; Man: manose)

A análise FTIR confirmou a primeira hipótese, confirmando que o espectro das amostras analisadas correspondia essencialmente ao da D-glucose (figura 34).

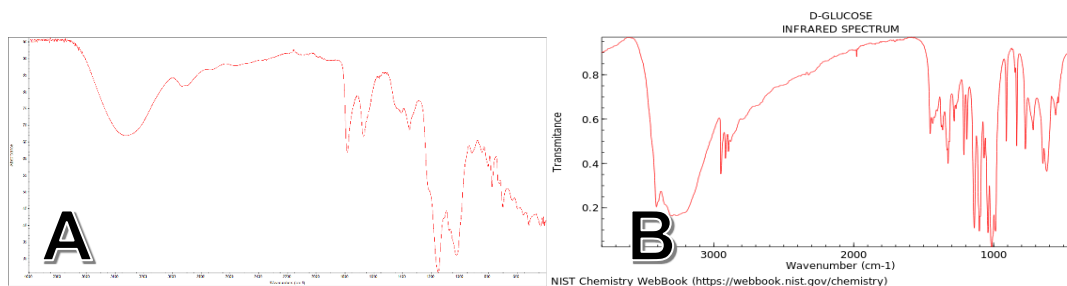


Figura 34: FTIR com espectro da amostra de EPS hidrolisado de *Weissella cibaria* PFM1679 (A) e espectro da D-Glucose (National Institut of Standards and Technology)(B)

Por HPLC, com coluna Sugar-Pak, verifica-se um pico de tempo de retenção a 9,3min correspondendo igualmente à D-glucose (Figura 35).

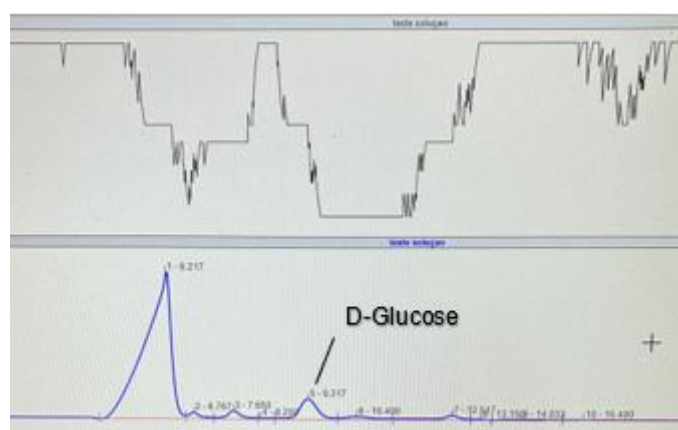


Figura 35: Cromatograma HPLC amostra EPS hidrolisado de PFM1679

Observou-se um segundo pico a 6,2min mais intenso correspondente à celobiose (segundo tabelas de tempo de retenção fornecidas com a coluna Sugar-Pak). No entanto, é pouco provável que esse dissacarídeo de glucose seja proveniente da hidrólise incompleta do EPS visto a sua baixa estabilidade térmica em meio ácido (Youngkook Kwon, 2012). Por isso a presença desse pico dever-se-á à formação de intermediários durante a hidrólise ácida de homopolissacarídeos onde ocorrem ligações estruturais como α -1,3 ou α -1,4 (mais resistentes ao ácido do que as ligações α -1,6) levando à eluição (com a coluna Sugar-Pak de troca iónica) de oligossacarídeos nesta região (Agblevor FA, 2007; Ndegwa Henry Maina, 2011). Considerou-se assim como sendo um pico fantasma.

Estudos indicam uma composição de monossacarídeos para EPS provenientes de *Weissella cibaria* de 62% de glucose (passando a 97% quando adicionado sacarose ao meio de cultura), 34% de manose e 3,8% de frutose (Yu Y. J., 2018). No nosso caso obteve-se um resultado similar com a indicação de que a composição do EPS parece dever-se a maioritariamente à D-glucose. Ou seja, um glucano que, pela literatura existente para *Weissella*, possivelmente será um dextrano. Este resultado preliminar requer confirmação por outros métodos de análise. A composição por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (GC-MS) e análise por ressonância magnética nuclear (RMN) poderão dar indicações mais conclusivas relativamente à composição e estrutura do exopolissacarídeo.

4. Potencial probiótico e segurança

4.1. Fatores de virulência

Em relação aos fatores de virulência testados, não se verificou a existência de qualquer expressão dos mesmos (tabela 8).

Tabela 8: Resultados dos testes de virulência das estirpes

		Gelatinase	Lipase	DNase test	lisina descarboxilase	hemolise
PFM 1501	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	γ
PFM1660	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	γ
PFM1679	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	γ
PFM1703	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	γ
PFM1861	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	γ
PFM1862	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	γ
PFM1863	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	-	γ
B391	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	γ

A atividade da gelatinase é um fator de virulência relevante devido à capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro através da hidrólise do colagénio, fibrinogénio e frações do complemento, o que favorece a disseminação bacteriana a partir do intestino, sendo um critério de exclusão na seleção dos probióticos. No entanto essa atividade não foi detetada nas estirpes em estudo.

A presença de DNase nas LAB é um indicador de fator de virulência relevante devido à capacidade de degradar DNA extracelular e neutralizar assim as NETs (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos constituídas de DNA e 64 proteínas) que têm como função a eliminação de patogénicos através da formação de pus. No entanto essa atividade enzimática não foi detetada

O mesmo se verificou para a lisina descarboxilase (fig 36 B). A capacidade de produzir aminas biogénicas é considerada um fator de virulência nas LAB. São compostos produzidos pelas bactérias decorrente da degradação enzimática de aminoácidos através de descarboxilases. A HDC (Histidina Descarboxilase) produz histamina responsável por reações alérgicas graves, a TDC (Tirosina Descarboxilase) produz a tiramina que provoca hipertensão e enxaquecas, e a LDC e ODC (Lisina e Ornitina descarboxilases) produzem putrescina e cadaverina que vão potenciar os efeitos das outras aminas (Gomes, 2014). De futuro, para um estudo mais completo usar-se á um meio de cultura base elaborado e otimizado (Bover-Cid S, 1999) cujo aminoácido a testar será adicionado, até porque a deteção de todas as restantes aminas biogénicas é um requisito de segurança obrigatório para as estirpes serem candidatas a probióticos.

A atividade hemolítica é um dos principais indicadores de virulência. Uma hemólise β é uma hemólise completa (total), uma hemólise α (parcial) é menos severa, mas pode ter alguma relevância e uma hemólise γ é a ausência de hemolisinas, candidatando a estirpe a uma aplicação probiótica. Não se observou qualquer atividade hemolítica (fig 36 A), nem α nem β , em meio agar sangue.

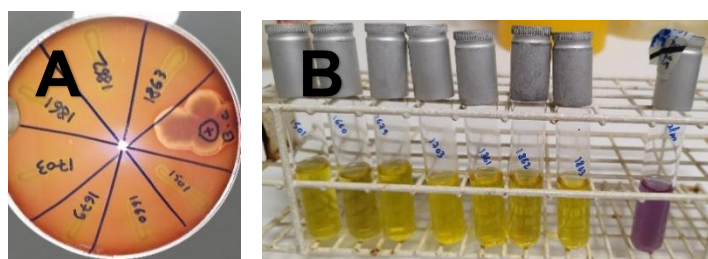


Figura 36: atividade hemolítica das *Weissella cibaria* (A) e da lisina descarboxilase (B) – Fonte V. Monteiro

Na grande maioria dos estudos existentes, a ausência de fatores de virulência para estirpes de *Weissella cibaria* é comum (Jang, 2021; Lee, 2026; Aditya Willy Putra, 2026; Fanelli F, 2023) relatando quase exclusivamente a sua resistência intrínseca à vancomicina.

4.2. Resistência ao sal

Estudos mostraram a capacidade das LAB em resistir a concentrações moderadas de NaCl. Em 31 estirpes de LAB submetidas a concentrações entre 3 e 5 % (m/V), verificou-se uma redução do crescimento das mesmas até 68 % para concentrações de 5 % (Ndiaye A, 2024). Em relação à *Weissella*, tolerâncias até 6,5 % de NaCl foram observadas em *Weissella cibaria* e *Weissella confusa* (Kang Wook Lee, 2012) e 5,2 % noutro ensaio de halotolerância para *Weissella cibaria* (G. K. González-Quijano, 2014).

As estirpes em análise de *Weissella cibaria* obtiveram resultados indicadores de uma muita boa capacidade de resistência a concentrações de sal até 7-8% (m/V) (Figura 37).

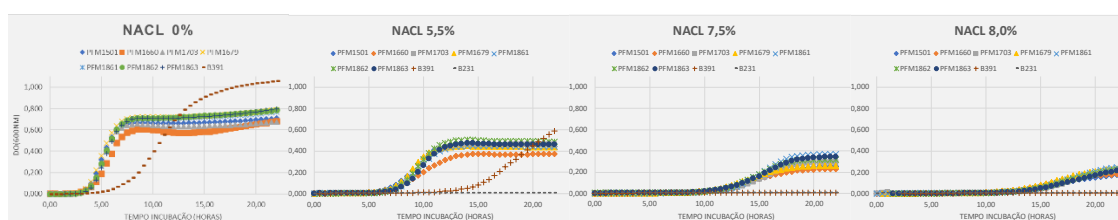


Figura 37: Resistência a concentrações crescentes de NaCl

Ao confirmarem-se os resultados obtidos neste estudo, parece haver uma resistência ao sal acima da média pelo o que está descrito na escassa bibliografia sobre o assunto.

4.3. Atividade antioxidante

Para os testes de ABTS+ e DPPH nos CFS e extrato intercelular, observou-se uma forte atividade antioxidante dos controlos constituídos pelos meios de cultura WMBG e WMBS. É um fenómeno documentado na literatura científica explicado pela atividade antioxidante inerente à constituição de meios ricos especialmente os que contêm triptona e extrato de levedura, fontes ricas em alguns aminoácidos como o triptofano, tirosina e a cisteína e a presença de vitaminas (Ji-Hyun Kim, 2026). Não ter em consideração esse fenómeno implica a introdução de um viés metodológico, para além de que o consumo de aminoácidos para o crescimento das estirpes pode induzir uma redução da atividade antioxidante basal (do próprio meio) o que pode falsear o resultado quando aplicada a correção do branco. Devido a essas limitações poder-se-ia optar por métodos celulares como CAA (Cellular Antioxidant Activity) ou

enzimáticos (SOD – Superóxido Dismutase ou catalase) mais específicos e menos suscetíveis a interferências da matriz (Li, 2019).

Apesar das LAB não sintetizarem TPC, a determinação do TPC foi realizada pelo facto de algumas LABs poderem sintetizar enzimas hidrolíticas que libertam e desconjugam compostos fenólicos ligados à matriz alimentar. Nos ensaios de determinação dos TPC, não se observou qualquer atividade antioxidante derivada da presença de possíveis compostos fenólicos ou à interferência da matriz. No ensaio de TPC (Total Phenolic Compounds) todas as amostras deram valores de 0,0 mg/mL GAE. Este resultado era previsível, pois não se conhece capacidade de produção de compostos fenólicos pelas *Weissella*.

Os testes de atividade antioxidantes aos EPS purificados das estirpes produtoras indicaram atividade antioxidante elevada (tabela 9) revelada pelo método do ABTS.

Tabela 9: Atividade antioxidante do P-EPS das estirpes produtoras de EPS

	TPC			DPPH				ABTS+									
	mg/mL equi. Acido gálico			mg/mL equi. Trolox		% DPPH		d	g/mL Equiv. Trolox		% ABTS+	d					
Weissella cibaria PFM1501	0,00	±	0,00	0,0	±	0,0	0,0	±	0,0	6	1,98	±	0,23	79,9	±	9,6	6
Weissella cibaria PFM1679	0,00	±	0,00	0,0	±	0,0	0,0	±	0,0	6	2,10	±	0,11	84,8	±	4,4	6
Weissella cibaria PFM1703	0,00	±	0,00	17,1	±	0,0	0,0	±	0,0	6	2,22	±	0,03	89,9	±	1,4	6
Weissella cibaria PFM1861	0,00	±	0,00	436,8	±	50,5	26,0	±	3,7	6	2,38	±	0,07	96,6	±	3,0	6
Weissella cibaria PFM1862	0,00	±	0,00	74,5	±	42,8	0,0	±	0,0	6	2,33	±	0,12	94,6	±	4,8	6
Weissella cibaria PFM1863	0,00	±	0,00	0,0	±	0,0	0,0	±	0,0	6	2,17	±	0,10	88,0	±	4,1	6

d: fator de diluição: não entrou no cálculo das percentagens de neutralização (DPPH e ABTS). Já tido em conta para o cálculo do TEAC.

Os valores de TPC foram nulos em todas as amostras de EPS-P, o que indica que não contêm compostos fenólicos. Os resultados são compatíveis com o tipo de amostra analisada visto serem constituídas por EPS purificados (açúcar) e não por anéis fenólicos. A ausência valida o procedimento de purificação do EPS, pois as etapas de purificação constituída pela precipitação por etanol, a diálise (elimina compostos <3,5kDa) e a ultrafiltração (retém compostos >10kDa) removem estes compostos de baixo peso molecular.

Os resultados do ABTS indicaram uma percentagem de neutralização, de amostras de EPS diluídas 6 vezes, entre 80 e 97 %, o que aponta para uma elevada capacidade antioxidante. Estes resultados são corroborados pelos

valores altos do TEAC (entre 2,0 e 2,4 g/mL TEAC). A capacidade antioxidante do EPS produzido pelas estirpes de *Weissella cibaria* é assim muito elevado.

Os resultados do DPPH indicam uma ausência de atividade antioxidante em todas amostras (exceto PFM1861) o que parece contrariar os resultados do ABTS. No entanto, os dois ensaios não medem a mesma coisa e a literatura indica que podem dar resultados muito diferentes para a mesma amostra. Enquanto o ABTS é mais sensível a compostos hidrofílicos (dadores de eletrões ou hidrogénio) em meios aquosos (como o EPS-P em solução), o DPPH responde melhor a antioxidantes mais lipofílicos ou moléculas pequenas (Zhu Y, 2018; Kedare SB, 2011), o que não é o caso do EPS.

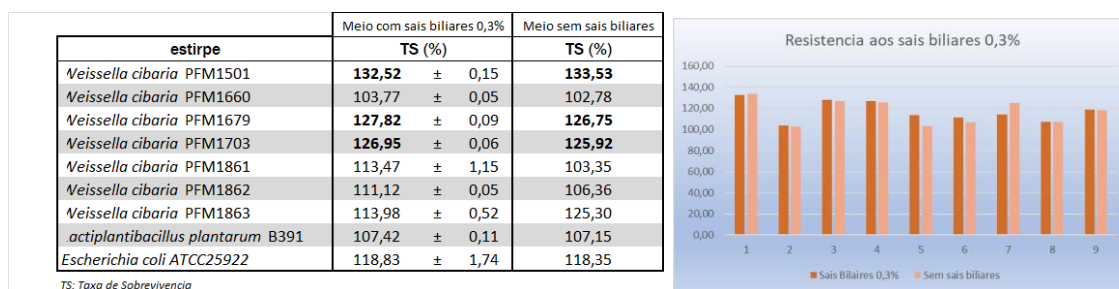
Por isso os resultados gerais são consistentes, dado que o ABTS é mais adequado para antioxidantes hidrofílicos e macromoléculas polissacarídicas como o EPS purificado em solução aquosa das nossas amostras.

4.4. Resistência aos sais biliares

Os sais biliares são componentes da bile que podem inibir o crescimento bacteriano. Uma resistência a concentrações de sais biliares de 0,3 % (m/V) é uma condição à sobrevivência dos probióticos no trato intestinal (Brodkorb, 2019).

Os testes indicaram que todas as estirpes cumprem com os critérios de resistência aos sais biliares (tabela 10). Destacam-se as estirpes PFM1501, PFM1679 e PFM1703 com taxas de sobrevivência elevadas (132,52 %; 127,82 % e 126,95 % respetivamente) que indicam a inação dos sais biliares (nem bacteriostático nem bactericida) e um crescimento normal das estirpes. Quando comparado com o crescimento em meio sem sais biliares obtemos praticamente o mesmo resultado o que indica uma resistência intrínseca das estirpes à bñlis.

Tabela 10: teste de resistência aos sais biliares 0,3%



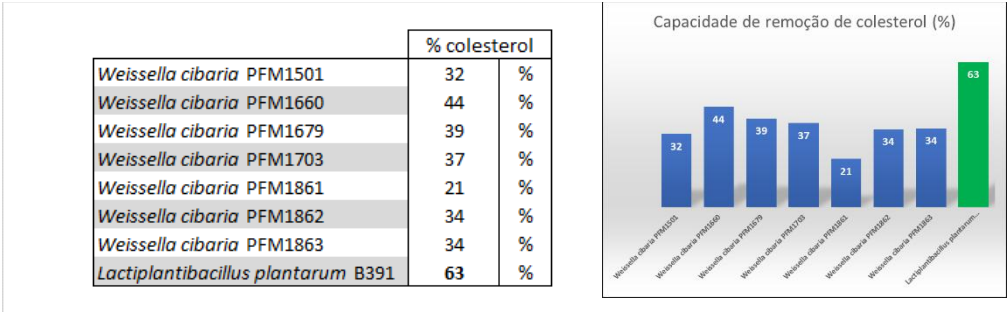
Em vários estudos autores mostram taxas de sobrevivência semelhantes na ordem dos 128,8 % para *Weissella confusa* 31 (Kang Wook Lee, 2012) e 74,91 % para *Weissella cibaria* SLC (Aditya Willy Putra, 2026).

4.5. Remoção do colesterol

A capacidade duma estirpe probiótica em reduzir o nível de colesterol num meio de cultura é um bom indicador do potencial metabólico funcional para reduzir, ao nível do trato gastrointestinal do hospedeiro, a absorção de colesterol e assim modular a hipercolesterolemia.

Das 8 estirpes estudadas, 7 exibem boa capacidade de remoção de colesterol (tabela 11) traduzindo-se por taxas compreendidas entre 21 e 44 %. A estirpe controlo B391 tem uma taxa de remoção excecional de 63 %. Num estudo com *Lactiplantibacillus plantarum* E680 o resultado obtido foi próximo, com uma taxa de remoção de colesterol de 67 % (Zheng ZY, 2020). O mesmo valor foi determinado noutro estudo com *Lactobacillus fermentum* SM-7 (Pan, 2011). Taxas de remoção de colesterol acima dos 50% são consideradas excecionais na avaliação de caraterísticas probióticas.

Tabela 11: Percentagem de remoção do colesterol



As taxas de *Weissella cibaria*, ainda assim, são consideradas como biologicamente relevantes. Num estudo com 6 estirpes de LAB (*Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Lactococcus*) foram conseguidas taxas entre 35,5% e 55,6% (Ali SM, 2022). Taxas de até 25% foram conseguidas em estudos com *Weissella spp* (Liu C. A., 2025). Destacam-se as estirpes PFM1660, PFM1679 e PFM1703 como sendo mais relevantes e de maior interesse. No entanto, a capacidade de remoção determinada por si só não será suficiente pois autores combinam este resultado com a tolerância aos sais biliares e outros critérios que definem a “probioticidade”.

A remoção (diminuição) do colesterol depende de 3 fatores: a assimilação direta pelos microrganismos, a ação da bÍlis (aumenta a capacidade de assimilação em condições anaerÓbias) e a presença de sais biliares desconjugados (Derek K. Walker, 1993). *In vivo*, os sais biliares estão combinados (conjugados) com aminoácidos para facilitar a digestão das gorduras. No intestino, as bactÉrias do microbiota provocam a desconjugação dos sais biliares (perda do aminoácido) para facilitar a sua reabsorção a nÍvel intestinal (Almeida & Almeida). *In vitro*, a capacidade em desconjugar sais biliares pode traduzir-se no aumento indireto da taxa de remoção do colesterol pois, sais biliares desconjugados podem precipitar com o colesterol presente.

4.6. Testes de adesão celular

4.6.1. Hidrofobicidade superficial

A hidrofobicidade superficial estÁ relacionada com a adesão às células intestinais do hospedeiro, o que indica a capacidade de persistência no trato gastrointestinal, o poder de competir com patogénicos para a adesão à mucosa intestinal e a interação com a mesma.

Tabela 12: Hidrofobicidade com o xileno

XILENO	%H	desvio padrão
<i>Weissella cibaria</i> PFM1501	2,48	± 0,88
<i>Weissella cibaria</i> PFM1660	0,33	± 0,00
<i>Weissella cibaria</i> PFM1679	6,47	± 1,12
<i>Weissella cibaria</i> PFM1703	5,17	± 0,84
<i>Weissella cibaria</i> PFM1861	4,64	± 0,52
<i>Weissella cibaria</i> PFM1862	0,64	± 0,46
<i>Weissella cibaria</i> PFM1863	2,52	± 0,46
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> B391	73,22	± 0,76

Na literatura científica, num teste MATH com uso de xileno, a hidrofobicidade é geralmente considerada baixa (0-35%), moderada (36-70%) ou alta (>71%) (Piwat, 2015).

Nos nossos ensaios, para as *Weissella cibaria* as taxas de hidrofobicidade obtidas podem ser consideradas baixas, indo de 0,33 % (PFM1660) a 6,47 % (para PFM1679) como indicado na tabela 12. Em estudos semelhantes com o xileno foram encontradas hidrofobicidades de 5,81 a 42,52 % para estirpes de

Lactobacillus casei (Vijendra Mishra, 2005) sendo que o resultado pode variar consoante as estirpes e os hidrocarbonetos usados. Com o hexadecano conseguem-se taxas de hidrofobicidade mais elevadas. Esse é o hidrocarboneto mais recomendado em estudos de hidrofobicidade pois apresenta menor toxicidade para as células tendo em conta a menor interação com as membranas celulares e minimizando a lise (M. Rosenberg D. G., 1980; Marín, 1997; Rosenberg, 2006). Um estudo de (Nachtigall, 2020) poderá também explicar esses baixos valores pelo facto de microrganismos como *Weissella cibaria* serem produtores de EPS, mas também de exopolissacarídeos capsulares (CPS), ligados à membrana celular, que afetam as propriedades hidrofóbicas superficiais, reduzindo a exposição das partes mais hidrofóbicas da parede celular e por isso tendo um impacto na determinação da capacidade de adesão. Como resultado a superfície torna-se mais hidrofílica. Para verificar esse efeito poderíamos praticar a remoção do CPS antes do ensaio, sem dano para as células (Nachtigall, 2020). Como a produção de EPS é maior com a sacarose, poderíamos do mesmo modo comparar se resulta num menor valor, quando comparado com a glucose.

Para a estirpe controlo B391, obtivemos uma hidrofobicidade de mais de 73% no termo de 1 hora. Na literatura, a hidrofobicidade medida através de ensaios MATH é considerada alta quando >70 % (Piwat, 2015). Em estudos semelhantes foram encontrada taxas de 48,5 % (*L.plantarum* 2.2), 58,6 % (*L.plantarum* A1), 60,6 % (*L.plantarum* 2.1) e 82,8 (*L.plantarum* A2) para tempos de sedimentação de 2 h (Piwat, 2015).

4.6.2. Autoagregação - Coagregação

4.6.2.1. Autoagregação

A autoagregação (interação da mesma estirpe ou interação homotípica) avalia a capacidade da estirpe formar aglomerados permitindo a adesão à mucosa intestinal mesmo sob o efeito do peristaltismo e facilitando a formação de biofilmes. A taxa de sedimentação foi medida ao longo de 5 h (Figura 38).

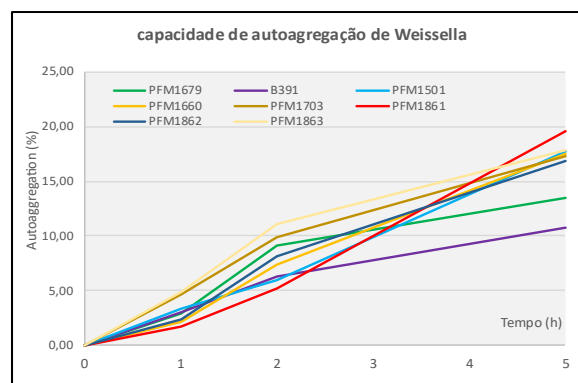


Figura 38: capacidade de autoagregação de *Weissella* ao longo de 5h

Os resultados mostraram que as estirpes de *Weissella cibaria* apresentam uma autoagregação moderada-baixa (entre 13,50 e 19,59 %) ao fim de 5 h.

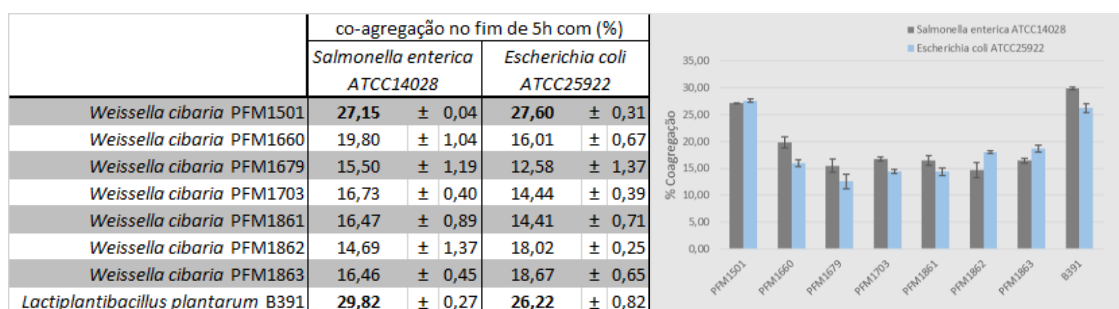
Num estudo foram encontradas taxas de autoagregação de estirpes de *Weissella spp* e *Lactobacillus spp* da ordem dos 18 a 79% ao fim de 4 h, considerando as estirpes mais promissoras acima de 50 % (Marimuthu Anandharaj, 2015).

Resultados baixos para as *Weissella* podem ser explicados pelos mesmos processos explicados anteriormente (hidrofobicidade) que indicam que poderá haver um efeito do CPS na capacidade de agregação das células. No entanto, para as *Weissella*, a autoagregação considerada isoladamente não constitui uma avaliação definitiva da sua capacidade probiótica pois outros fatores como a produção de EPS podem conferir-lhes uma excelente capacidade de adesão às células intestinais (Fanelli F, 2023).

4.6.2.2. Coagregação:

A coagregação (Kos B., 2003; Handley PS, 1987) avalia a interação entre estirpes diferentes (heterotípica), indicando a capacidade do probiótico impedir a adesão do patogénico à mucosa e até a ter uma ação antagonista contra ele *via* a produção de antimicrobiano como bacteriocinas.

Tabela 13: capacidade de coagregação das estirpes em estudo com *Salmonella* e *Escherichia coli*



Os resultados de coagregação ao fim de 5h com *E.coli* e *Salmonella* não são muito diferentes (tabela 13). Estes valores indicam, para as estirpes em estudo, uma capacidade moderada-fraca em ligarem-se ao patogénico. Os resultados foram comparáveis aos encontrados na literatura para o género *Weissella*.

Se relacionarmos a autoagregação e a coagregação (Figura 39), entre as *Weissella* destacamos a estirpe de ***Weissella cibaria* PFM1501** (cerca de 27 %) como a que apresenta melhores características de adesão, sendo mais eficaz em ligar-se a *E.coli*. A estirpe PFM1679 apresentou das menores afinidades pelos patogénicos. A variabilidade observada entre *Weissella* da mesma espécie mostra a necessidade de triagem das estirpes mais promissoras com objetivo de futura aplicação tecnológica.

Seria interessante relacionar a quantidade de EPS produzido com os índices de autoagregação e coagregação para verificar se existe uma correlação entre ambos que eventualmente explicaria o menor efeito nos fatores de adesão determinados.

A estirpe *Lactiplantibacillus plantarum* B391, apesar da sua menor taxa de autoagregação, apresenta índices de coagregação mais robustos (29%) (Figura 41).

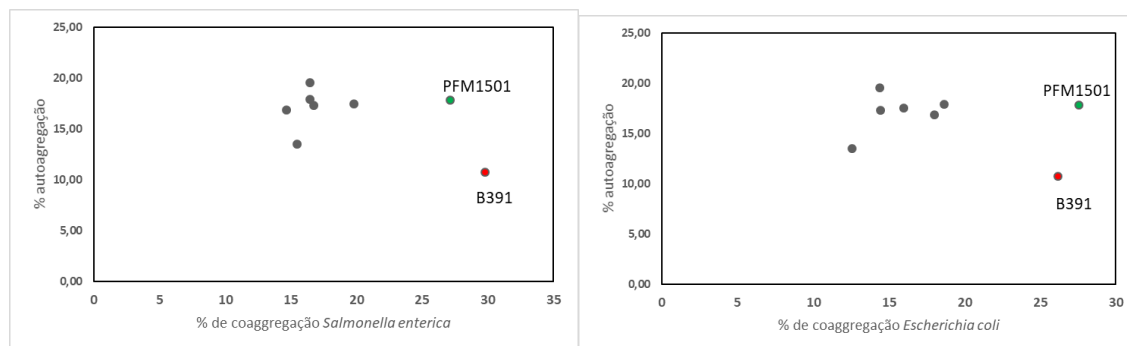


Figura 39: Relação entre índices de autoagregação e coagregação

CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu validar e caracterizar o potencial biotecnológico das estirpes de *Weissella cibaria* provenientes de ecossistemas tradicionais.

As *Weissella cibaria* demonstraram igualmente, nas condições culturais definidas (pH de 6,5; temperatura de crescimento de 37°C) ótimas características tecnofuncionais, com capacidade excepcional de biossíntese de exopolissacarídeos, provavelmente um dextrano, a partir de sacarose, atingindo altos rendimentos gravimétricos da ordem do grama por litro e com margem para maiores produções. Como probiótico, apresentam boa capacidade para atuar na redução do colesterol e uma excelente resistência à biliar (saís biliares), com particular destaque para as estirpes PFM1501, PFM1679 e PFM1660, sendo que PFM1660 não é produtora de EPS.

As estirpes de *Weissella cibaria* também apresentaram uma elevada tolerância a concentrações de NaCl (até 7,5% m/V) o que as coloca acima de valores reportados para esta espécie na literatura disponível. Esse aspecto torna-as particularmente interessantes do ponto de vista tecnológico.

De notar que todas as estirpes de *Weissella cibaria* revelaram notável atividade antimicrobiana contra estirpes bacterianas de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, e um bolor *Penicillium* sp, através dum mecanismo de ação que não parece envolver exportação de bacteriocinas para o meio.

Em termos de parâmetros de segurança, podemos considerar os perfis estabelecidos como favoráveis, mas ainda incompletos. No entanto, destacam-se nitidamente as estirpes PFM1501 e PFM1679 como as que reúnem as qualidades fundamentais para estudos futuros. A estirpe PFM1679 apresenta um espectro mais alargado de tolerância ao pH. Faltaram os ensaios de resistências a antibióticos que são primordiais para a caracterização do potencial probiótico das estirpes, assim como os ensaios de virulência respetivos à produção de aminas biogénicas (ornitina, histidina e tirosina).

Seria importante desenvolver ensaios de simulação total da digestão para verificar a capacidade de tolerância aos vários ambientes, enzimas e sucos

orogastrointestinais. Testes compartimentados não permitem uma visão abrangente das diferentes condições encontradas *in vivo*.

Finalmente, a fim de completar os testes de probiocidade, também dever-se-á realizar teste de adesão às células intestinais humanas (CACO2) para uma visão mais larga da capacidade real de adesão das estirpes de *Weissella cibaria*.

A estirpe de *Weissella cibaria* PFM1679 parece a mais promissora, não só como probiótico pelas suas características de tolerância à acidez, ao NaCl, a tolerância aos sais biliares e sua boa capacidade de remoção do colesterol, mas também pela capacidade de produção de antimicrobianos e sua excelente capacidade de produção de EPS.

Não é possível terminar sem abordar a perspectiva de integração da bioinformática e da análise genómica (Whole-Genome Sequencing - WGS) aos métodos microbiológicos e bioquímicos tradicionais aplicados a este estudo. Através da mineração genómica (*genome mining*), torna-se possível a prospeção rápida e de alto rendimento (high-throughput) do metaboloma secundário, identificando *clusters* de genes biossintéticos (BGCs) associados à produção de bacteriocinas, exopolissacarídeos e outros compostos bioativos de valor tecnológico ou funcional. No âmbito da avaliação de segurança, de acordo com as diretrizes de organismos reguladores como a EFSA e a FDA, as abordagens *in silico* mostrariam uma determinação inequívoca e exaustiva sobre a presença ou ausência de determinantes de virulência, de profagos ou de genes de resistência a antibióticos (ARG). Seria de considerar a transição para plataformas computacionais que permitissem garantir uma caracterização rigorosa das estirpes em estudo que consolidassem o estatuto de segurança e o potencial biotecnológico e probiótico destas estirpes de *W. cibaria* na indústria alimentar e em particular com a estirpe PFM1679 que apresentou melhor potencial.

Bibliografia

- A.T. Adesulu-Dahunsi, A. S. (2018). Production, characterization and In vitro antioxidant activities of exopolysaccharide from *Weissella cibaria* GA44. *LWT*, 432-442. doi:10.1016/j.lwt.2017.09.013
- Aditya Willy Putra, M. M. (2026). Probiotic Potential and Molecular Characterization of *Weissella cibaria* Isolated from Sala Lauak, a Traditional Indonesian Fermented Food. *European Journal of Biology*. doi:10.26650/EurJBiol.2026.1829175
- Agblevor FA, H. B. (2007). Analysis of biomass sugars using a novel HPLC method. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. doi:10.1007/s12010-007-9028-4
- Alain, K. Q. (2009). Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, 583-594. doi:10.1007/s00792-009-0261-3
- Ali SM, S. F. (2022). Hypolipidemic activity of lactic acid bacteria: Adjunct therapy for potential probiotics. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0269953
- Allen RJ, W. B. (2018). Bacterial growth: a statistical physicist's guide. *Reports on Progress in Physics*. doi:10.1088/1361-6633/aae546
- Almeida, N. d., & Almeida, U. G. (s.d.). Diarreia indizada por sais biliares e suas associações com o supercrescimento bacteriano do delgado. Em *Gastroenterologia e Hepatologia*. Editora Pasteur.
- Amaretti A., B. B. (2020). Potential prebiotic effect of a long-chain dextran produced by *Weissella cibaria*: an in vitro evaluation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 563-571. doi:10.1080/09637486.2019.1711026
- Ampemohotti, T. S. (2025). Molecular Mechanisms and Antioxidant Effects of *Latilactobacillus sakei* F1, *Lactocaseibacillus paracasei* D2, *Lactocaseibacillus rhamnosus* JL, and *Weissella cibaria* JLK Isolated from Spontaneously Fermented and Raw Food Products. *Foods*. doi:10.3390/foods14193395
- Apostolakos, I. P. (2022). Functional and Safety Characterization of *Weissella paramesenteroides* Strains Isolated from Dairy Products through Whole-Genome Sequencing and Comparative Genomics. *Dairy*, 799-813. doi:10.3390/dairy3040055
- Ara Koh, F. D.-D. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, 1332-1345. doi:10.1016/j.cell.2016.05.041
- Asiegbu, C. T. (2026). Prospecting and characterization of potential probiotic lactobacilli from animal gut and food sources. *Nature - Scientific Reports*. doi:10.1038/s41598-026-47302-2

- Avinash Kant Lakra, L. D. (2020). Some probiotic potential of *Weissella confusa* MD1 and *Weissella cibaria* MD2 isolated from fermented batter. *LWT*. doi:10.1016/j.lwt.2020.109261
- Balciunas E.M., C. M. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 134-142. doi:10.1016/j.foodcont.2012.11.025
- Barrett, E. R. (2007). Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures. *Applied and environmental microbiology*, 2333–2337. doi:10.1128/AEM.01855-06
- Benzie, I. F. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*, 15-27. doi:10.1016/s0076-6879(99)99005-5
- BfR – Bundesinstitut für Risikobewertung. (2021). *BfR Consumer Monitor 2021: Special additives in food*. Obtido de <https://www.bfr.bund.de/cm/364/bfr-consumer-monitor-2021-special-additives-in-food.pdf>
- Biermann, F., Wenski, S., & Helfrich, J. (2022). Navigating and expanding the roadmap of natural product genome mining tools. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 1656-1671. doi:10.3762/bjoc.18.178
- Björkroth J, D. L. (2014). The genus *Weissella*, in *Lactic Acid Bacteria, Biodiversity and Taxonomy*, First. Wiley Blackwell.
- Björkroth K. J, S. U. (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 141–148.
- Boutin, S., & Dalpke, A. H. (2020). The Microbiome: A Reservoir to Discover New Antimicrobials Agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1291-1299. doi:10.2174/1568026620666200320112731
- Bover-Cid S, H. W. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 33-41. doi:10.1016/s0168-1605(99)00152-x
- Brodkorb, A. E. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 991-1014. doi:10.1038/s41596-018-0119-1
- Cachon, R. D. (1994). Generalized model of the effect of pH on lactate fermentation and citrate bioconversion in *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* biovar. *diacetylactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 694-699. doi:10.1007/BF00167287

- Camila Gonçalves Teixeira, A. F. (2021). Biodiversity and technological features of Weissella isolates obtained from Brazilian artisanal cheese-producing regions. *LWT*. doi:10.1016/j.lwt.2021.111474
- Carvalho, M. J. (2015). Isolamento e caracterização de bacteriocinas com potencial interesse na área alimentar. *Tese de Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar*. Viana do Castelo: Instituto Politécnico de Viana do Castelo.
- Cem Okan Özer, B. K. (2020). Utilization of optimized processing conditions for high yield synthesis of conjugated linoleic acid by *L. plantarum* AB20–961 and *L. plantarum* DSM2601 in semi-dry fermented sausage. *Meat Science*. doi:10.1016/j.meatsci.2020.108218
- Chen Liu, C. A. (2024). Evaluation of Safety and Probiotic Properties of Weissella spp. in Fermented Vegetables From Xi'an, Shaanxi, China. *Food Science & Nutrition*. doi:10.1002/fsn3.4592
- Chen, G. R. (2018). Sodium Butyrate Inhibits Inflammation and Maintains Epithelium Barrier Integrity in a TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model. *EBioMedicine*, 317-325. doi:10.1016/j.ebiom.2018.03.030
- Chettri, D. C. (2024). Molecular Approaches to Microbial Identification of Industrially Significant Strains. Em *Industrial Microbiology and Biotechnology*. Springer, Singapura. doi:10.1007/978-981-97-1912-9_7
- Collins MD, S. J. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, 595–603. doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb01600.x
- Cotter, P. D. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food.
- Cotter, P. D. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 95-105. doi:10.1038/nrmicro2937
- Dachev M, B. J. (2021). The Effects of Conjugated Linoleic Acids on Cancer. *Processes*. doi:10.3390/pr9030454
- De Lima R.N., L. J. (2018). The importance of conjugated linoleic acid (CLA) in animal-derived products - Importância do ácido linoleico conjugado (CLA) em produtos de origem animal. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*. doi:10.17765/2176-9168.2018v11n4p1307-1331
- de Moraes, G. d. (2017). Functional Properties of Lactobacillus mucosae Strains Isolated from Brazilian Goat Milk. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 235-245. doi:10.1007/s12602-016-9244-8

- de Souza PM, d. O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 850-861. doi:10.1590/S1517-83822010000400004
- De Vuyst, L. S. (2002). The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Applied and environmental microbiology*, 6059-6069. doi:10.1128/AEM.68.12.6059-6069.2002
- Delves-Broughton, J. B. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin .
- Derek K. Walker, S. E. (1993). Relationships Among Bile Tolerance, Bile Salt Deconjugation, and Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*1. *Journal of Dairy Science*, 956-961. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77422-6
- Dillon, V. (2014). NATURAL ANTI-MICROBIAL SYSTEMS | Preservative Effects During Storage. Em C. A. Tortorello, *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*.
- Duarte, L. M. (2019). Review transglutaminases: part II-industrial applications in food, biotechnology, textiles and leather products. *World journal of microbiology & biotechnology*. doi:10.1007/s11274-019-2792-9
- Echavarría, A. P. (2012). Melanoidins Formed by Maillard Reaction in Food and Their Biological Activity. *Food Engineering Reviews*, 203-223. doi:10.1007/s12393-012-9057-9
- Ennahar, S. &. (2004). Genetic evidence that *Weissella kimchii* Choi et al. 2002 is a later heterotypic synonym of *Weissella cibaria* Björkroth et al. 2002. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 463-465. doi:org/10.1099/ijls.0.02783-0
- Fanelli F, M. M. (2023). Probiotic Potential and Safety Assessment of Type Strains of *Weissella* and *Periweissella* Species. *Microbiology Spectrum*. doi:10.1128/spectrum.03047-22
- Fang, W. B. (2006). Leucocins 4010 from *Leuconostoc carnosum* cause a matrix related decrease in intracellular pH of *Listeria monocytogenes*. *FEMS microbiology letters*, 208-213. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00219.x
- Fashogbon R.O., S. O.-T. (2024). Microbial gamma-aminobutyric acid synthesis: a promising approach for functional food and pharmaceutical applications. *Letters in Applied Microbiology*. doi:10.1093/lambio/ovae122
- Fernandes, P., Daniela, L., Victor, M., Carla, R., LA, N., SD, T., & Joana, G. (2017). *Lactobacillus plantarum* isolated from cheese: production and partial characterization of bacteriocin B391. *Annals of Microbiology*, 433-442. doi:10.1007/s13213-0

- Fessard, A., & Remize, F. (2017). Review: Why Are Weissella spp. Not Used as Commercial Starter Cultures for Food Fermentation? *Fermentation*. doi:10.3390/fermentation3030038
- Fhoula I, R. A.-I. (2018). Functional Probiotic Assessment and In Vivo Cholesterol-Lowering Efficacy of Weissella sp. Associated with Arid Lands Living-Hosts. *BIOMED Research International*. doi:10.1155/2018/1654151
- Fhoula, I. B. (2022). Antimicrobial activity and safety features assessment of Weissella spp. from environmental sources. *Food science & nutrition*, 2896-2910. doi:10.1002/fsn3.2885
- Filipe De Vadder, P. K.-D. (2014). Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell*, 84-96. doi:10.1016/j.cell.2013.12.016
- Fortune Business Insights. (2026). *Food Supplements - Probiotic Market*. Obtido de <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/probiotics-market-100083>
- Fusco Vincenzina, Q. G.-S. (2015). The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2015.00155
- Fusco, W. L. (2023). Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients*. doi:10.3390/nu15092211
- G. K. González-Quijano, L. D.-Á.-S.-F.-F.-P.-R. (2014). Halotolerance and Survival Kinetics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Jalapeño Pepper (*Capsicum annuum* L.) Fermentation. *Journal of Food Science*. doi:10.1111/1750-3841.12498
- G. LeBlanc, J. L. (2011). B-Group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*, 1297-1309. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05157.x
- Gandra EA, G. T. (2008). Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Scientiarum - Technology*, 109–118.
- Garvie, E. (1967). The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *Journal of General Microbiology*, 439–447. doi:10.1099/00221287-48-3-439
- Generalić Mekinić, I. &. (2025). Bioactive Compounds in Foods: New and Novel Sources, Characterization, Strategies, and Applications. *Foods*. doi:10.3390/foods14091617
- Gillor, O. E. (2008). The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-008-1726-5

- Gomes, M. B. (2014). O risco das aminas biogênicas nos alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva [online]*. doi:10.1590/1413-81232014194.18672012
- Görke, B. S. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 613-624. doi:10.1038/nrmicro1932
- GPAI. (2026). *GPAI*.
- Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. *OCL*. doi:10.1051/ocl/2017031
- Guerreiro, J. M. (2014). Lactobacillus pentosus B231 Isolated from a Portuguese PDO Cheese: Production and Partial Characterization of Its Bacteriocin. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 95-104. doi:10.1007/s12602-014-9157-3
- H. Boumerdassi, C. M. (1997). Effect of Citrate on Production of Diacetyl and Acetoin by Lactococcus lactis ssp. lactis CNRZ 483 Cultivated in the Presence of Oxygen. *Journal of Dairy Science*, 634-639. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)75981-2
- Hak-Jong Choi, C.-I. C.-B.-C.-W.-W.-M.-R. (2002). Weissella kimchii sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi:10.1099/00207713-52-2-507
- Handley PS, H. D. (1987). A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of Streptococcus salivarius. *Journal of General Microbiology*, 3207-3217. doi:10.1099/00221287-133-11-3207
- Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis (7th ed.)*. USA: W. H. Freeman and Company (New York).
- Henok Ashagrie, K. B. (2025). The use of propionic and lactic acid bacteria to produce cobalamin and folate in injera, an Ethiopian cereal-based fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110909
- Hernández-Alcántara AM, C. R.-M. (2022). Weissella cibaria riboflavin-overproducing and dextran-producing strains useful for the development of functional bread. *Frontiers in Nutrition*. doi:10.3389/fnut.2022.978831
- Holzapfel W. H, V. W. (1982). Lactobacillus kandleri sp. nov., a New Species of the Subgenus Betabacterium, with Glycine in the Peptidoglycan,. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 495–502. doi:10.1016/s0721-9571(82)80007-0

- Hoover SE, P. A. (2015). A new quorum-sensing system (TprA/PhrA) for *Streptococcus pneumoniae* D39 that regulates a lantibiotic biosynthesis gene cluster. *Mol Microbiol.*, 229-243. doi:10.1111/mmi.13029
- Husain, Q. (2010). Beta galactosidases and their potential applications: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 41-62. doi:10.3109/07388550903330497
- Iorizzo, M. D. (2024). Linoleic Acid (CLA) by *Lactiplantibacillus plantarum*: A Review with Emphasis on Fermented Foods. *Foods*. doi:10.3390/foods13070975
- ISO 11133:2014/Amd2: 2020. (s.d.). ISO 11133:2014/Amd2: 2020. *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture*. ISO - International Organization for Standardization.
- ISO 7218:2024. (s.d.). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological. ISO.
- IUPAC. (2009). Goldbook. doi:10.1351/goldbook.G02645
- J. Barbosa, P. G. (2010). Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control*, 651-656. doi:10.1016/j.foodcont.2009.10.002
- J.H. Cummings, E. P. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. doi:10.1136/gut.28.10.1221
- Jang, Y.-J. G.-M.-S.-H.-Y. (2021). Safety Evaluation of *Weissella cibaria* JW15 by Phenotypic and Genotypic Property Analysis. *Microorganisms*. doi:10.3390/microorganisms9122450
- Ji-Hyun Kim, C.-G. H. (2026). Baseline ABTS Radical Scavenging Capacities of Common Microbial Media and the Impact of Sterilization Methods. *Jundishapur Journal of Microbiology*. doi:10.5812/jjm-168486
- Juvonen, R. H. (2015). The impact of fermentation with exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on rheological, chemical and sensory properties of pureed carrots (*Daucus carota* L.). *International journal of food microbiology*, 109-118. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.031
- Kang M.S, Y. J. (2019). Safety Evaluation of Oral Care Probiotics *Weissella cibaria* CMU and CMS1 by Phenotypic and Genotypic Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms20112693
- Kang Wook Lee, J. Y. (2012). Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe*, 92-102. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.12.015
- Kang, B. K. (2016). Red pepper powder is a crucial factor that influences the ontogeny of *Weissella cibaria* during kimchi fermentation. *Scientific reports*. doi:10.1038/srep28232

- Kariyawasam, R. J.-K.-D. (2019). Characterization of cottage cheese using *Weissella cibaria* D30: Physicochemical, antioxidant, and antilisterial properties. *Journal of Dairy Science*. doi:10.3168/jds.2018-15360
- Kaushik JK, K. A. (2009). Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0008099
- Kedare SB, S. R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1
- Kim JH, K. Y. (2016). Conjugated Linoleic Acid: Potential Health Benefits as a Functional Food Ingredient. *Annu Rev Food Sci Technol.*, 221-44. doi:10.1146/annurev-food-041715-033028
- Knychala, M. M. (2024). Precision Fermentation as an Alternative to Animal Protein, a Review. *Fermentation*. doi:10.3390/fermentation10060315
- Koch, L. A. (1970). Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments. *Analytical biochemistry*, 252-259. doi:10.1016/0003-2697(70)90174-0
- Kos B, S. J. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol*, 981-987. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x
- Kos B., S. J. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 981-987. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x
- Kotwal, S. M. (2009). Immobilized invertase. *Biotechnology advances*, 311-322. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.01.009
- Krooneman, J. F. (2002). *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 639-646. doi:10.1099/00207713-52-2-639
- Kumar A., D. S. (2024). Microbial enzymes and major applications in the food industry: a concise review. *Food Production, Processing and Nutrition*. doi:10.1186/s43014-024-00261-5
- Kumar, A. G. (2010). Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical reviews in biotechnology*, 243-258. doi:Critical reviews in biotechnology
- Kunzes Angmo, A. K. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh,. *Food Science and Technology*, 428-435. doi:10.1016/j.lwt.2015.10.057

- L.L. Rudel, M. M. (1973). Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *Journal of Lipid Research*, 364-366. doi:10.1016/S0022-2275(20)36896-6
- Lakra AK, D. L. (2020). Physicochemical and functional characterization of mannan exopolysaccharide from *Weissella confusa* MD1 with bioactivities. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.139
- Le Bars, D. &. (2008). Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. *Journal of applied microbiology*, 171-177. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03539.x
- Lee J-S, L. K.-S.-I. (2002). *Weissella koreensis* sp . nov ., isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1257–1261.
- Lee, M. G. (2026). Genomic and phenotypic analysis of *Weissella cibaria* LB13201 and LB13206 isolated from Hanwoo (native Korean cattle) with antimicrobial and anti-inflammatory capability. *Frontiers in microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2026.1674601
- Lehnen T.E., d. S. (2015). A review on effects of conjugated linoleic fatty acid (CLA) upon body composition and energetic metabolism. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. doi:10.1186/s12970-015-0097-4
- Leroy F, V. L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 67-78.
- Leslie VA, A. K. (2021). Bacteriocin producing microbes with bactericidal activity against multidrug resistant pathogens. *Journal of Infection and Public Health*. doi:10.1016/j.jiph.2021.09.029
- Li M, C. C. (2021). Organic Acid Exposure Enhances Virulence in Some *Listeria monocytogenes* Strains Using the *Galleria mellonella* Infection Model. *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2021.675241
- Li, S. W. (2019). Effect of deproteinization methods on the antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Lentinus edodes* stipe. *Food Measure*, 1382-1389. doi:10.1007/s11694-019-00054-2
- Linton, J. (1991). Metabolite production and growth efficiency. *Antonie van Leeuwenhoek*, 293-311. doi:10.1007/BF00430371
- Liu D, T. W. (2022). Advances in *Polygonatum sibiricum* polysaccharides: Extraction, purification, structure, biosynthesis, and bioactivity. *Frontiers in Nutrition*. doi:10.3389/fnut.2022.1074671
- Liu, C. A. (2024). Evaluation of Safety and Probiotic Properties of *Weissella* spp. in Fermented Vegetables From Xi'an, Shaanxi, China. *Food Science & Nutrition*. doi:10.1002/fsn3.4592

- Liu, C. A. (2025). Evaluation of Safety and Probiotic Properties of *Weissella* spp. in Fermented Vegetables From Xi'an, Shaanxi, China. *Food Science and Nutrition*. doi:10.1002/fsn3.4592
- Liu, C. W. (2022). Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated From Fermented Vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2021.774903
- Liu, X. Q. (2020). Application of *Weissella cibaria* X31 or *Weissella confusa* L2 as a starter in low nitrite dry-fermented sausages. *International Journal of Food Engineering*. doi:10.1515/ijfe-2019-0344
- Loureiro, D. S. (2015). Estudos da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* B391 para potencial utilização na Indústria. *Tese de Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar*. Viana do Castelo.
- Luís M. Magalhães, M. A. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 1-19. doi:10.1016/j.aca.2008.02.047
- M. Dubois, A. G. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Em *Analytical Chemistry*. ASC Publication. doi:10.1021/ac60111a017
- M. Rosenberg, D. G. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 29-33. doi:10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x
- M. Rosenberg, D. G. (1980). ADHERENCE OF BACTERIA TO HYDROCARBONS: A SIMPLE METHOD FOR MEASURING CELL-SURFACE HYDROPHOBICITY. *FEMS Microbiology Letters*.
- Ma, S. N. (2018). Juice Clarification with Pectinase Reduces Yeast Assimilable Nitrogen in Apple Juice without Affecting the Polyphenol Composition in Cider. *Journal of food science*, 2772-2781. doi:10.1111/1750-3841.14367
- MacFaddin, J. (1981). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. Batimore: 2nd ed. Williams and Wilkins.
- Macieira A., B. D.-V. (2018). Effects of *Lactobacillus plantarum* bacteriocinogenic culture on physicochemical, microbiological, and sensorial characteristics of "Chouriço Vinha d'Alhos", A traditional Portuguese Sausage. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 118-127. doi:10.29252/jfqhc.5.4.2
- Magnusson J., J. H. (2002). *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 831-834. doi:10.1099/ijls.0.02015-0
- Maldonado-Barragán, A. C.-G.-P.-B. (2013). Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among plantaricin-producing *Lactobacillus*

- plantarum strains with different regulatory operons. *Food microbiology*, 40-47. doi:10.1016/j.fm.2012.08.009
- Malinska H, H. M. (2015). Conjugated linoleic acid reduces visceral and ectopic lipid accumulation and insulin resistance in chronic severe hypertriacylglycerolemia. *Nutrition.*, 1045-51. doi:10.1016/j.nut.2015.03.011
- Manguntungi B., M. A. (2021). The profile analysis of lactic acid bacteria (Lab) from sumbawa white honey and its potential producing antibacterial compounds. *Walailak Journal of Science and Technology*. doi:10.48048/wjst.2021.22204
- Marimuthu Anandharaj, B. S. (2015). Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing Lactobacillus and Weissella strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Research in Microbiology*, 428-439. doi:10.1016/j.resmic.2015.03.002
- Marín, M. L. (1997). Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. *Letters in applied microbiology*. doi:10.1046/j.1472-765x.1997.00334.x
- Marina Levata-Jovanovic, W. E. (1996). Citrate Utilization and Diacetyl Production by Various Strains of Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris1. *Journal of Dairy Science*, 1928-1935. doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76562-1
- Maślak, E. Z.-S.-F. (2022). Isolation and Identification of Lactococcus lactis and Weissella cibaria Strains from Fermented Beetroot and an Investigation of Their Properties as Potential Starter Cultures and Probiotics. *Foods*. doi:10.3390/foods11152257
- Mauriello, G. E. (2004). Development of polythene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from Lactobacillus curvatus 32Y. *Journal of Applied Microbiology*, 314-322. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02299.x
- Mensink RP, S. T. (2016). The Increasing Use of Interesterified Lipids in the Food Supply and Their Effects on Health Parameters. *Advance in Nutrition*, 719-729. doi:10.3945/an.115.009662
- Mingyue Zhou, Y. Y. (2023). Polysaccharides from Chinese herbs as natural weapons against colorectal cancer. *Bioscience Reports*. doi:10.1042/BSR20230041
- Monnet V, G. R. (2015). Quorum-sensing regulators in Gram-positive bacteria: 'cherchez le peptide'. *Molecular Microbiololy*, 181-184. doi:10.1111/mmi.13060
- Montes, Y. C. (2024). Growth kinetics of Lactococcus lactis and Lactobacillus casei in liquid culture medium containing as prebiotics inulin or fructose.

- Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1258-1270.
doi:10.1002/jsfa.13032
- Mora-Villalobos, J. A.-Z.-G.-S.-W.-G. (2020). Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation*. doi:10.3390/fermentation6010023
- Mouro, C. G. (2024). Microbial Exopolysaccharides: Structure, Diversity, Applications, and Future Frontiers in Sustainable Functional Materials. *Polysaccharides*, 241-287. doi:10.3390/polysaccharides5030018
- Murata, R. S. (2025). Exploring lactic acid bacteria in food, human health, and agriculture. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*.
doi:10.1080/10408398.2025.2493236
- N. Chateau, A. D. (1994). Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Letters in Applied Microbiology*, 42-44. doi:10.1111/j.1472-765X.1994.tb00796.x
- Nachtigall, C. V. (2020). How Capsular Exopolysaccharides Affect Cell Surface Properties of Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*.
doi:10.3390/microorganisms8121904
- Nam H, H. M. (2002). Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 4642-4645. doi:10.1128/AEM.68.9.4642-4645.2002
- Nami, Y. V. (2019). Probiotic Properties of *Enterococcus* Isolated From Artisanal Dairy Products. *Frontiers in microbiology*.
doi:10.3389/fmicb.2019.00300
- Navarre WW, S. O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 174-229. doi:10.1128/MMBR.63.1.174-229.1999
- Ndegwa Henry Maina, L. V. (2011). Structural Analysis of Enzyme-Resistant Isomaltooligosaccharides Reveals the Elongation of α -(1 $\rightarrow$ 3)-Linked Branches in *Weissella confusa* Dextran. *Biomacromolecules*, 409-418. doi:10.1021/bm1011536
- Ndiaye A, F. I. (2024). High-throughput characterization of the effect of sodium chloride and potassium chloride on 31 lactic acid bacteria and their co-cultures. *Frontiers Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2024.1328416
- Negash, A., & Tsehai, B. (2020). Current applications of bacteriocin. *International Journal of Microbiology*. doi:10.1155/2020/4374891
- Nelson, D., & Cox, M. (2008). *Principles of Biochemistry*. Lehninger.
- Newswire, P. (2022). *Functional Food Ingredients Global Market Report 2022*. Obtido de <https://www.prnewswire.com/news-releases/functional-food-ingredients-global-market-report-2022-301709635.html>

- Onanong Pringsulaka, N. T. (2011). Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. *Food Control*, 547-551. doi:10.1016/j.foodcont.2011.08.029
- Özcan, E. S. (2019). A genome-scale metabolic network of the aroma bacterium *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremori*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-019-09630-4
- P. Louis, G. H. (2014). The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*, 661-672. doi:10.1038/nrmicro3344
- Pan Liu, Z.-Q. Y.-Z.-J.-G. (2024). Antifungal activity of metabolites of *Weissella cibaria* KM14 isolated from traditional Korean food kimchi against three spoilage fungi. *LWT*. doi:10.1016/j.lwt.2024.116545
- Pan, D. D. (2011). *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of the science of food and agriculture*, 512-518. doi:10.1002/jsfa.4214
- Paramithiotis, S. (2025). *Lactiplantibacillus plantarum*, the Integral Member of Vegetable Fermentations. *Applied Biosciences*. doi:10.3390/applbiosci4010007
- Pasquale Filannino, Y. B. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, 272-279. doi:10.1016/j.fm.2014.08.018
- Peng, H. Z. (2022). Transcriptomic Analysis Revealed Antimicrobial Mechanisms of *Lactobacillus rhamnosus* SCB0119 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*. doi:10.3390/ijms232315159
- Pérez-Ramos, A. M.-M. (2021). Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins. *Microorganisms*. doi:10.3390/microorganisms9102107
- Pérez-Ramos, A., Madi-Moussa, D., Coucheney, F., & Drider, D. (2021). Current knowledge of the mode of action and immunity mechanisms of LAB-Bacteriocins. *Microorganisms*. doi:10.3390/microorganisms9102107
- Peter Albersheim, D. J. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, 340-345. doi:10.1016/S0008-6215(00)80510-8
- Piard JC, L. Y. (2005). Utilização das bactérias lácticas no centro dos novos desafios. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*.
- Piard, J. D. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le Lait*.
- Piluka, E. R. (2021). *Comparação de Dois Métodos de Avaliação da Atividade Antioxidante*. Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar ESA do

Instituto Plitécnico de Beja. Obtido de
<https://hdl.handle.net/20.500.12207/5769>

- Piwat, S. S. (2015). An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of *Lactobacillus* strains derived from the human oral cavity. *Letters in Applied Microbiology*, 98-105. doi:10.1111/lam.12434
- Portugal Foods. (02 de 2026). *Tendências de inovação e consumo no setor agroalimentar em 2026*. Obtido de <https://www.portugalfoods.org/noticias/trends-2026/>
- Prakash, O. S. (2013). Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51-62. doi:10.1007/s00253-012-4533-y
- Quattrini, M. D. (2020). A Polyphasic Approach to Characterize *Weissella* Cibaria and *Weissella confusa* Strains. *Journal of Applied Microbiology*, 500-512. doi:10.1111/jam.14483
- Rahmanian, N. J. (2014). Recovery and Removal of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater. *Journal of the American Oil Chemists Society*. doi:10.1007/s11746-013-2350-9
- Rao, T. J. (2013). A novel high dextran yielding *Weissella cibaria* JAG8 for cereal food application. *International journal of food sciences and nutrition*, 346–354. doi:10.3109/09637486.2012.734289
- Raveendran, S. P. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food technology and biotechnology*, 16-30. doi:10.17113/ftb.56.01.18.5491
- Rebello S., A. M. (2017). Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 381-394. doi:10.1007/s11157-017-9437-y
- Ricciardi A., P. E. (2009). Modelling the growth of *Weissella cibaria* as a function of fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 1528 - 1535. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04335.x
- Roberta Re, N. P.-E. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1231-1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Rocha, R. C.-V. (2023). Microbiological Characterization of Protected Designation of Origin Serra da Estrela Cheese. *Foods*. doi:10.3390/foods12102008
- Rosenberg, M. (2006). Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS microbiology letters*, 129-134. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x

- Rossi, M. A. (2011). Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients*, 118-134. doi:10.3390/nu3010118
- Rotta, I. S. (2025). Exploring the potential of *Weissella paramesenteroides* UFTM 2.6.1 in disrupting quorum sensing and attenuating virulence in *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2025.1601203
- Ruas-Madiedo P, H. J. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 163-171.
- Sabo, S. d. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. . *Food Research International*, 527-536.
- Sagar Aryal, P. (04 de 08 de 2025). *Microbe Notes*. Obtido de McFarland Standards: Principle, Preparation, Uses, Limitations: <https://microbenotes.com/mcfarland-standards/>
- Salimi, F. &. (2023). Recent advances in the biological activities of microbial exopolysaccharides. *World journal of microbiology & biotechnology*. doi:10.1007/s11274-023-03660-x
- Salsinha, A., Machado, M., Rodríguez-Alcalá, L., Gomes, A., & Pintado, M. (2022). *Bioactive lipids: Chemistry, biochemistry, and biological properties*. Cambridge, MA, USA: Academic Press.
- Santos, E. M. (2005). Characterization and identification of lactic acid bacteria in "morcilla de Burgos. *International journal of food microbiology*, 258-296. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.021
- Savijoki K., I. H. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-006-0427-1
- Sengun, I. Y. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International journal of food microbiology*, 105-111. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.033
- Sharma K., K. S. (2021). Classification and mechanism of bacteriocin induced cell death: A review. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. doi:10.15414/jmbfs.3733
- Sharma, A. G. (2019). Enzyme Engineering: Current Trends and Future Perspectives. *Food Reviews International*, 121-154. doi:10.1080/87559129.2019.1695835
- Sharma, P. S. (2024). Antioxidant potential of exopolysaccharides from lactic acid bacteria: A comprehensive review. *International journal of biological macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.135536
- Shi, Y. C. (2019). Antioxidative and Probiotic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China.

Probiotics & Antimicro. Prot., 1086-1099. doi:10.1007/s12602-018-9452-5

Siegmundfeldt H, B. R. (2000). Dynamic Changes of Intracellular pH in Individual Lactic Acid Bacterium Cells in Response to a Rapid Drop in Extracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.66.6.2330-2335.2000

Sinaga D.P., T. D. (2021). Fermentation Process Effect to Enhance Antioxidant and Antibacterial Activity of Phenolic Compounds and Its Possible Application to Galactomannan Polysaccharides: A Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. doi:10.1088/1755-1315/1097/1/012027

Singh Jahnvi Kumari, D. P. (2024). Biosynthesis, classification, properties, and applications of Weissella bacteriocins. *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2024.1406904

Singh N, G. R. (2025). Exploring the antimicrobial potential of lactobacilli against early-stage and mature biofilms of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Chemistry*. doi:10.3389/fchem.2025.1425666

Singleton, V. L. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144

Solis-Balandra MA, S.-S. J. (2024). Classification and Multi-Functional Use of Bacteriocins in Health, Biotechnology, and Food Industry. *Antibiotics (Basel)*. doi:10.3390/antibiotics13070666

Spencer, J. F., & Spencer, A. R. (2001). *Methods in Biotechnology - Food Microbiology Protocols*. Totowa NJ, USA: Humana Press.

Srionnual S, Y. F. (2007). Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from Weissella cibaria 110, isolated from plaasom, a fermented fish product from Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.02484-06

Stasiak-Róžańska L, G. J.-P. (2025). Co-Fermentation and Genomic Insights into Lactic Acid Bacteria for Enhanced Propionic Acid Production Using a Non-GMO Approach. *Foods*. doi:10.3390/foods14091573

Sutherland, I. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, 41-46.

Sybesma, W. B. (2004). Multivitamin production in Lactococcus lactis using metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 109-115. doi:10.1016/j.ymben.2003.11.002

- Tang H, H. W. (2023). The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microbial Cell*. doi:10.15698/mic2023.03.792
- Teixeira CG, B. Y.-D. (2024). Assessment of safety and in situ antibacterial activity of *Weissella cibaria* strains isolated from dairy farms in Minas Gerais State, Brazil, for their food application. *Brazilian Journal of Microbiology*, 699-714. doi:10.1007/s42770-023-01244
- Teixeira CG, F. A. (2021). *Weissella*: An Emerging Bacterium with Promising Health Benefits. *Probiotics Antimicrob Proteins*. doi:10.1007/s12602-021-09751-1
- Thuy, H. L. (2018). Deproteinization in purification of exopolysaccharide from *Ophiocordyceps sinensis* olive oil-stimulated culture. *thaiscience.info*.
- Tian, M. W. (2025). A comprehensive safety assessment of a novel starter *Weissella confusa* M1 combining with whole-genome sequencing. *Food research international*. doi:10.1016/j.foodres.2025.115748
- Tingirikari, J. M. (2014). Structural and biocompatibility properties of dextran from *Weissella cibaria* JAG8 as food additive. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 686–691. doi:10.3109/09637486.2014.917147
- Todorov S.D., d. A. (2025). Phenolic Compounds and Bacteriocins: Mechanisms, Interactions, and Applications in Food Preservation and Safety. *Molecular Nutrition and Food Research*. doi:10.1002/mnfr.202400723
- Todorov, S., V.F.Alves, Popov, I., Weeks, R., Pinto, U., Petrov, N., . . . Chikindas, M. (2024). Antimicrobial Compounds in Wine. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. doi:10.1007/s12602-023-10177-0
- United Nations. (2024). *World Population Prospects 2024*. Obtido de Department of Economic and Social Affairs - Population Division: <https://population.un.org/wpp/>
- van der Hee B., W. J. (2021). Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends in Microbiology*. doi: 10.1016/j.tim.2021.02.001
- van Gunst, A. &. (2019). Consumer Distrust about E-numbers: A Qualitative Study among Food Experts. *Foods*,. doi:10.3390/foods8050178
- Vijendra Mishra, D. P. (2005). Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 109-115. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.047
- W. Brand-Williams, M. C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5

- Weerapong Woraprayote, L. P. (2018). Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with Bacteriocin 7293 for control of pathogenic bacteria in pangasius fish fillets. *LWT*. doi:10.1016/j.lwt.2017.10.026
- Wongsuphachat, W. H.-K. (2010). Optimization of exopolysaccharides production by *Weissella confusa* NH 02 isolated from Thai fermented sausages. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27-35.
- Wu C., C. H. (2024). Advances in research on microbial conjugated linoleic acid bioconversion. *Progress in Lipid Research*. doi:10.1016/j.plipres.2023.101257
- Xiao, Y. Y. (2025). Evaluation and mechanism of the antioxidant activity of lactic acid bacteria. *Folia microbiologica*, 711–727. doi:10.1007/s12223-025-01277-1
- Xiaojuan Tang, B. Z. (2019). Hydration, water distribution and microstructure of gluten during freeze thaw process: Role of a high molecular weight dextran produced by *Weissella confusa* QS813. *Food Hydrocolloids*, 377-384. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.10.025
- Xie X., R. K.-S. (2023). A novel γ -aminobutyric acid biosynthetic pathway in *Lentilactobacillus curieae* CCTCC M 2011381T. *Process Biochemistry*, 160-167. doi:10.1016/j.procbio.2022.11.013
- Yanagida, F. C. (2007). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from lakes. *Journal of Basic Microbiology*, 184–190. doi:10.1002/jobm.200610237
- Yeu, J.-E. L.-G.-Y.-S. (2021). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of *Weissella cibaria* against Pathogens of Upper Respiratory Tract Infections. *Microorganisms*. doi:10.3390/microorganisms9061181
- Yi, E.-J. &.-J. (2023). Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Bacteriocin-Producing *Pediococcus inopinatus* K35 Isolated from Kimchi against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. doi:10.3390/antibiotics12040676
- Youngkook Kwon, S. E. (2012). Cellobiose Hydrolysis and Decomposition by Electrochemical Generation of Acid and Hydroxyl Radicals. *Cellobiose Hydrolysis and Decomposition by Electrochemical Generation of Acid and Hydroxyl Radicals*, 1935-1943. doi:10.1002/cssc.201200250
- Yu, L. Y. (2023). Purification, characterization and probiotic proliferation effect of exopolysaccharides produced by *Lactiplantibacillus plantarum* HDC-01 isolated from sauerkraut. *Frontiers in microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2023.1210302
- Yu, Y. J. (2018). Production, Characterization and Antibacterial Activity of Exopolysaccharide From a Newly Isolated *Weissella cibaria* Under Sucrose Effect. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 769-777. doi:10.1016/j.jbiosc.2018.05.028

- Yuxi Lang, N. G. (2024). Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review. *Journal of Future Foods*, 193-204. doi:10.1016/j.jfutfo.2023.07.002
- Zacharof, M., & Lovitt, R. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*.
- Zannini, E. J. (2018). Development of novel quinoa-based yoghurt fermented with dextran producer *Weissella cibaria* MG1. *International journal of food microbiology*. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.001
- Zannini, E. M. (2013). Barley malt wort fermentation by exopolysaccharide-forming *Weissella cibaria* MG1 for the production of a novel beverage. *Journal of applied microbiology*, 1379–1387. doi:10.1111/jam.12329
- Zeidan A. A, P. V. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS microbiology reviews*, 168-200.
- Zheng ZY, C. F. (2020). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* E680 and its effect on Hypercholesterolemic mice. *BMC Microbiology*. doi:10.1186/s12866-020-01922-4
- Zhongyue Li, D. Z. (2018). Review: Discovery of novel bioactive natural products driven by genome mining. *Drug Discoveries & Therapeutics*. doi:10.5582/ddt.2018.01066
- Zhou B., W. C. (2024). Structural Characterization and Biological Properties Analysis of Exopolysaccharides Produced by *Weissella cibaria* HDL-4. *Polymers*. doi:10.3390/polym16162314
- Zhu Y, W. C. (2018). Purification, characterization and antioxidant activity of the exopolysaccharide from *Weissella cibaria* SJ14 isolated from Sichuan paocai. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.067
- Zimina, M. B. (2020). Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. *Antibiotics*. doi:10.3390/antibiotics9090553
- Zuljan, F. A. (2014). α -Acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* contributes to pH homeostasis in acid stress conditions. *International journal of food microbiology*, 99-107. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.017

