

**PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE *Lactobacillus plantarum* ISOLADO DE  
SALAMES ARTESANAIS E APLICADO COMO CULTIVO INICIADOR EM  
SALAME TIPO MILANO**

**Por**

**MARISTELA CORTEZ SAWITZKI**

Tese apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Ciência dos Alimentos da  
Universidade Federal de Santa Catarina (SC),  
como requisito parcial para a obtenção do grau  
de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, SC – Brasil

2007

S271p Sawitzki, Maristela Cortez.  
Propriedades tecnológicas de *Lactobacillus plantarum* isolado de salames artesanais e aplicado como cultivo iniciador em salame tipo milano / Maristela Cortez Sawitzki. – Florianópolis, 2007. – 89 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina.  
Ciência de Alimentos.

Orientação: Ernani Sebastião Sant'Anna.

1. Ciência – alimentos. 2. *L. plantarum*. 3. Salame tipo milano. 4. Propriedades tecnológicas. I. Sant'Anna, Ernani Sebastião. II. Título.

CDU : 663

664

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

A COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA, APROVA A TESE

**PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE *Lactobacillus plantarum* ISOLADO DE  
SALAMES ARTESANAIS E APLICADO COMO CULTIVO INICIADOR EM  
SALAME TIPO MILANO**

ELABORADA POR

**MARISTELA CORTEZ SAWITZKI**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR  
EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant’Anna – UFSC (Orientador)

Dra. Marisa Teresinha Bertol – EMPRAPA SUINOS e AVES –  
(Co – Orientadora)

Profa. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi - UFSC

Prof. Dr. Nelcindo Nascimento Terra – UFSM

Profa. Dra. Valéria Reginatto Spiller - UFSC

## AGRADECECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, especialmente ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade, disponibilidade de laboratórios de pesquisa e apoio na realização deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, em especial a EMBRAPA SUÍNOS E AVES em Concórdia/SC pelo fomento financeiro, disponibilidade de laboratórios de pesquisa e de recursos humanos, os quais foram substanciais na realização deste trabalho.

Ao Pólo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fronteira Noroeste e Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ, pela parceria e disponibilidade de laboratórios de pesquisa.

Aos Professores Dr. Ernani S. Sant’Anna e Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi, pela orientação e apoio na realização deste trabalho.

À Dra. Marisa Teresinha Bertol, pelo crédito e condução da parceria interinstitucional (EMBRAPA – UFSC e UNIJUÍ), pela orientação, apoio e disponibilidade a esse trabalho.

À Profa. M. Sc. Ângela Maria Fiorentini, pelo coleguismo, exímia dedicação, participação e auxílio neste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial ao Centro de Biotecnologia Agrícola pela disponibilidade de laboratórios de pesquisa e ao Prof. Dr. César Valmor Rombaldi e sua equipe de colaboradores Dr. Luciano Lucchetta e Doutorando Márcio Roggia Zanuzo.

Ao M. Sc. Fábio Cristiano Angonesi Brod (UFSC), à Carolini Tagliari (UFSC) e ao M. Sc. Anildo Cunha Júnior (EMBRAPA Suínos e Aves) pela colaboração prestada.

Ao Rosalvo Luis Sawitzki, esposo e parceiro, pelo apoio, motivação, segurança e dedicação à família, tornando possível minha dedicação para este trabalho.

Às filhas Greici, Gláucia e Graziela, pela compreensão, carinho, estímulo e apoio.

Aos professores e colegas pelo conhecimento socializado.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi obter uma cultura ácido láctica, como cultivo iniciador para produtos cárneos, isolada da microbiota natural de salames artesanais, produzidos na região Noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Os resultados da caracterização fenotípica e da PCR espécie-específica de dez culturas de bactérias ácido lácticas homofermentativas, Gram-positivas e catalase-negativas isoladas, permitiram a identificação de sete culturas como *Lactobacillus plantarum* e, portanto, foram investigadas as seguintes propriedades tecnológicas, destas culturas: habilidade para crescer em diferentes valores de pH, diferentes temperaturas, diferentes concentrações de sal, determinação dos isômeros D/L - ácido láctico, atividade nitrato redutase, atividade antagonística e estabilidade das culturas após processo de fermentação, concentração e liofilização. Todas as culturas apresentaram eficiência quanto às propriedades tecnológicas investigadas. A cultura *Lactobacillus plantarum* AJ2 foi selecionada e aplicada na massa cárnea do salame tipo Milano. A cultura láctica teve habilidade para adaptar-se e desenvolver-se no produto, promover a redução do pH nos primeiros sete dias de fermentação/maturação e menores níveis residuais de nitrito e nitrato, assim como menores valores de peróxidos e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em relação ao controle. O salame inoculado com a cultura láctica teve maior intensidade do brilho e da cor vermelha, mas, não apresentou diferenças no percentual da composição geral do produto e nas transformações químicas dos ácidos graxos livres, em relação ao controle.

**Palavras-chave:** *L. plantarum*; salame tipo Milano; propriedades tecnológicas

## ABSTRACT

The purpose of the present work was to obtain a lactic acid strain, promising as starter culture to meat products, isolated from naturally fermented artisanal sausage manufactured in the northwestern region of Rio Grande do Sul state, Brazil. The results of the phenotypic characterization and species-specific PCR of ten homofermentative, Gram-positive, catalase-negative lactic acid bacteria strains allowed identification of seven strains as *Lactobacillus plantarum* and therefore were investigated the following technological properties these strains: Ability to growth at different pH values, different temperatures, different salt concentrations and in the presence of commercial cure salt; fast production of acid; determination of D/L - lactic acid; activity nitrate reductase; antagonistic activity and stability of the isolates cultures over the fermentation, concentration and freeze-dried process. The isolated strains showed effectiveness to improve technological properties as starter culture. The *L. plantarum* AJ2 strain was selected and inoculated in the meat batter of the Milano-type salami. The lactic culture exhibited ability to grow in the product, to decrease pH in the first seven days of fermentation/ripening and residual level of nitrite and nitrate, as well as, values of peroxide and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The inoculated sausage had highest intensity of bright and red color, but did not show difference in the chemical composition and in the chemical changes of the free fatty acids, compared to control.

**Key words:** *L. plantarum*; Milano-type salami; technological properties

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vi
<b>Introdução</b> .....	1
<b>1 Referencial Teórico</b> .....	5
1.1 Fermentação: um recurso biotecnológico histórico na produção de alimentos.....	5
1.2 Identidade e qualidade do salame – característico produto cárneo fermentado .....	7
1.2.1 Qualidade do salame .....	9
1.2.1.1 Oxidação lipídica e implicações na qualidade do salame .....	14
1.2.2 Cultivos iniciadores: importantes agentes promotores da qualidade do salame.....	16
1.3 Bactérias ácido lácticas em produtos cárneos fermentados .....	20
1.3.1 Bactérias ácido lácticas - Gênero <i>Lactobacillus</i> .....	21
1.4 Cultivos iniciadores: uma oportunidade para o desenvolvimento do setor alimentício brasileiro .....	22
<b>2 Artigo 1:</b> Caracterização fenotípica e molecular e por PCR espécie-específica de linhagens promissoras como cultivos iniciadores de <i>Lactobacillus plantarum</i> isolados de salames artesanais fermentados naturalmente.....	30
<b>3 Artigo 2:</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> isolados de salames artesanais naturalmente fermentados e estudos de suas propriedades tecnológicas para aplicação como cultivos iniciadores .....	46
<b>4 Artigo 3:</b> <i>Lactobacillus plantarum</i> AJ2 isolado de salames artesanais naturalmente fermentados e seus efeitos nas propriedades tecnológicas do salame tipo Milano .....	64
<b>5 Considerações finais</b> .....	89

## Introdução

O Brasil se caracteriza como um país em desenvolvimento, onde há espaço físico, disponibilidade de recursos naturais e clima favorável, que oportunizam uma significativa produção de alimentos. Associada a estes fatores, a diversidade étnica e cultural faz com que seja realidade, no Brasil, a produção de alimentos em grande escala (grãos, leite, carnes, frutas, hortaliças, alimentos industrializados). E, de igual modo, uma diversidade de alimentos processados em pequenas unidades de produção familiar (de forma artesanal) ou em pequenas e médias agroindústrias (carne de sol, charque, produtos cárneos embutidos, geléias, queijos e frutas cristalizadas, entre outros produtos).

Em relação à produção de carne, o Brasil está entre os primeiros países produtores mundiais de carne avícola (38,64%), bovina (27,80%) e suína (10,43%) (FAO, 2006; MAPA/AGE, 2006) e, portanto, pode-se inferir que a produção de carnes é uma atividade de interesse econômico e geradora de divisas para o país. Neste cenário, a região Sul do Brasil apresenta significativo destaque, pois tem como um dos elementos substanciais de desenvolvimento a produção de carnes tanto *in natura* quanto industrializada. A vocação da região Sul para o desenvolvimento da cadeia produtiva de carnes e derivados tem origem na cultura italiana e germânica de imigrantes que colonizaram esta região e permanece até os dias atuais, seja em grandes empresas ou em pequenas e médias empresas e sistemas de agricultura familiar.

Outra questão relevante em relação à produção de carnes e derivados é a previsão de que deverá dobrar a demanda por produtos de origem animal em países em desenvolvimento ao longo dos próximos vinte anos, em razão do crescimento da população humana, do incremento da urbanização e do aumento do poder aquisitivo da população (STEINFELD, 2003; MAPA/AGE, 2006). Neste contexto, entende-se que o investimento em políticas de melhoria da produção primária, na agroindustrialização e em tecnologia de produção/processamento da carne é uma alternativa para o desenvolvimento e a sustentabilidade do setor, pois fomentará a qualidade e a viabilidade dos sistemas produtivos de agricultura/agroindústria familiar, das pequenas e médias empresas e também da grande indústria.

A qualidade e produtividade da carne *in natura* ou derivados, constitui-se num processo complexo em que se considera significativo o controle dos seguintes fatores: a disponibilidade e qualidade da matéria-prima e dos ingredientes; a qualidade do ambiente e dos procedimentos de produção; a tecnologia de produção, embalagem e armazenagem; a comercialização e a logística de distribuição do produto. A comercialização e a conquista de mercado são variáveis intervenientes para a viabilidade e o sucesso do negócio e, neste sentido, têm função decisiva tecnologias que possibilitem a produção de alimentos com propriedades organolépticas desejáveis, seguros e com baixo custo.

Na fabricação de derivados cárneos fermentados, um importante recurso tecnológico são os fermentos ou cultivos iniciadores, os quais promovem a qualidade sensorial, microbiológica e físico-química do produto. No Brasil, as grandes indústrias de derivados cárneos, considerando os benefícios dessa tecnologia, já a incorporaram em seus respectivos processos de produção, mas a pequena/média empresa ou os sistemas de agricultura familiar ainda carecem deste recurso. Outra realidade é a de que, para fins industriais, o Brasil importa os fermentos cárneos, os quais têm origem em hábitat diferentes das condições ambientais de produção brasileira e do substrato, o que pode interferir na adaptação e desenvolvimento do microrganismo.

Considerando o exposto e a importância do processo fermentativo de produtos cárneos, desenvolveu-se a presente pesquisa com os objetivos de obter uma espécie de bactéria ácido láctica como cultivo iniciador, a partir da microbiota natural de salames artesanais produzidos na região Sul do Brasil; realizar a caracterização fenotípica e molecular do cultivo; investigar suas respectivas propriedades tecnológicas como cultivo iniciador e aplicá-lo em salame (característico produto cárneo fermentado), avaliando as propriedades tecnológicas desenvolvidas no produto. O desenvolvimento e os resultados da pesquisa estão compilados na presente tese, através de três textos, estruturados de acordo com as exigências de publicações científicas indexadas em órgãos técnico-científicos internacionais.

A presente pesquisa fez parte do projeto interinstitucional “Desenvolvimento de cultivos iniciadores para o processamento de embutidos cárneos artesanais”,

aprovado em 2004 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (Código do Projeto: 03.03.2.33.00) e realizado em parceria com a EMBRAPA suínos e aves – Concórdia/SC, a Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis/SC e a UNIJUÍ – Campus Santa Rosa/RS.

Os microrganismos utilizados na pesquisa foram cedidos pelo Pólo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Região Fronteira Noroeste e Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – UNIJUÍ campus Santa Rosa, ambas as instituições localizadas na cidade de Santa Rosa, Estado do Rio Grande do Sul. O banco de culturas ácido lácticas e *Micrococaceae* foi obtido através do Projeto “Desenvolvimento e aplicação de cultivos iniciadores em produtos cárneos fermentados” empreendido no período de outubro de 2000 a junho de 2005, em parceria pela Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul – Programa de Apoio aos Pólos de Modernização Tecnológica e a UNIJUÍ. Participaram do referido projeto os pesquisadores: Prof<sup>a</sup>. M.Sc. Maristela Cortez Sawitzki – UNIJUÍ/UERGS, Prof<sup>a</sup>. M. Sc. Ângela Maria Fiorentini – UNIJUÍ, os bolsistas de iniciação científica da UNIJUÍ/CNPq Fábio Angonesi Brod – UNIJUÍ, Roger Matias da Silva e Carlos Henrique Pagno, e os colaboradores Prof. Dr. Nelcindo Nascimento Terra – UFSM e Prof. Dr. Ernani S. Sant’Anna – UFSC.

As culturas microbianas que compõem o referido banco de cepas foram isoladas a partir da microbiota natural de salames artesanais, produzidos e comercializados informalmente em 21 diferentes municípios da Região Fronteira Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Quarenta e duas amostras de salame (duas amostras de cada cidade e de diferentes produtores) foram coletadas aleatoriamente, em feiras, mercados e açougues, a partir de salames expostos em temperatura ambiente nos respectivos ambientes de coleta, em período de verão na região (temperatura média de 30°C). As referidas amostras de salames, não foram inoculadas com cultivos iniciadores e estavam com um período médio de sete dias de maturação. Logo que as amostras foram coletadas, foram congeladas e armazenadas a - 80 °C para posteriores análises. Para a obtenção das culturas, de cada amostra de salame foram isoladas, cultivadas e purificadas quatro colônias de bactérias ácido lácticas. De um total de cento e sessenta e oito culturas de bactérias ácido lácticas isoladas, cento e vinte e sete foram

caracterizadas como homofermentativas, Gram-positivas e catalase-negativas e, a partir destas, selecionou-se aleatoriamente (por sorteio) dez cultivos (codificados como AJ2, AL2, AB4, R2, AP3, C5, AF5, AD3, N3 e AM2) para serem utilizados no presente estudo.

A presente tese está estruturada com um referencial teórico sobre fermentações e o uso de cultivos iniciadores em alimentos - produtos cárneos e três artigos científicos: 1 - Caracterização fenotípica e por PCR espécie – específica de linhagens promissoras como cultivos iniciadores de *Lactobacillus plantarum* isolados de salames artesanais; 2 - Culturas de *L. plantarum* isolados de salames artesanais naturalmente fermentados e estudo de suas propriedades tecnológicas como cultivos iniciadores; e 3 - Propriedades tecnológicas da cultura *L. plantarum* AJ2 em salame tipo Milano. Além dos artigos, constam algumas considerações finais sobre a pesquisa desenvolvida.

## Referências

1. FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Animal Production and Health Division*. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>>. Acesso em 06 de março de 2006.
2. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA/ Assessoria de Gestão Estratégica - AGE. *Projeções do agronegócio*, 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 14 de abril 2006.
3. STEINFELD, H. Economic constraints on production and consumption of animal source foods for nutrition in developing countries. *Journal of Nutrition Online*, 133: 4054S - 4061S, 2003. Disponível em: <<http://www.nutrition.org/cgi/reprint.htm> > Acesso em 06 de março de 2006.

## **1 Referencial teórico**

### **1.1 Fermentação: um recurso biotecnológico histórico na produção de alimentos**

Modernos processos biotecnológicos de produção de alimentos e bebidas fermentadas têm origem na antiga fermentação empírica de alimentos. Desde a Antigüidade, o processo fermentativo de alimentos e bebidas é utilizado pelo homem com o objetivo de conferir ao alimento características organolépticas desejáveis e maior tempo de conservação. Conforme Ward (1989), a fermentação tem sido usada como uma arte durante muitos séculos, como, por exemplo, a elaboração do vinho já se praticava a não menos que 10.000 a.C. e historiadores crêem que os egípcios produziam cerveja nos anos 5.000 – 6.000 a.C. Há 4.000 a.C, egípcios utilizavam leveduras da cerveja para a produção de dióxido de carbono e conseqüente “crescimento” da massa do pão. As origens de uma grande variedade de alimentos e temperos fermentados procedentes do Oriente e de outras partes do mundo, que atualmente se sabe que estão embasadas nos processos de fermentação, produção e hidrólise de enzimas mediante métodos de cultivo de superfície, remontam claramente a muitos milhões de anos. Dados a respeito da transformação do leite constatam a produção de derivados lácteos como, por exemplo, o queijo, a 5.000 a.C. Conforme Jessen (1995), a origem dos produtos cárneos fermentados até agora permanece desconhecida, porém dados históricos sobre salame fermentado, datam de mais de 2000 anos no Mediterrâneo. Jay (2005, citando Pederson, 1971) relata que lingüiças fermentadas foram preparadas e consumidas pelos antigos babilônios e pelas pessoas da China antiga desde 1500 a.C.

Anterior às pesquisas de Louis Pasteur, o processo fermentativo era empírico e, segundo Geisen, Lücke & Kröckel (1992), não se relacionava à atividade metabólica dos microrganismos com as transformações desejáveis nos produtos obtidos. Segundo Pelczar et al. (1997) somente em 1857 com Pasteur e 1897 com Büchner, se deu o início dos estudos bioquímicos, confirmando a fermentação alcoólica, provocada por leveduras e, a partir deste período, podem-se citar importantes descobertas as quais consolidaram a microbiologia industrial:

em 1901, Rudolf Emmerich e Oscar Low isolaram um composto antibiótico (piocianase), produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, o qual foi utilizado no tratamento de pacientes e, em 1928, a penicilina, como antibiótico, foi descoberta por Fleming, sendo o primeiro antibiótico realmente efetivo..

O aprimoramento das técnicas de produção de alimentos fermentados, a descoberta de novas técnicas de separação e a purificação de compostos bioquímicos permitiram os primeiros empreendimentos na área de produção industrial de enzimas e de agentes potenciadores de sabor, como o glutamato monossódico. Outros fatores, como a produção de antibióticos durante a Segunda Guerra Mundial e a fabricação de produtos por fermentação (vitaminas, polissacarídeos, esteróides, proteínas, ácidos orgânicos...), tiveram significativa importância para a microbiologia e para as indústrias química, farmacêutica, de alimentos, bebidas e em outras áreas como energia e mineração (PELCZAR et al., 1997).

Atualmente, a indústria de alimentos e de bebidas, utiliza determinados grupos de microrganismos, selecionados a partir de determinadas características bioquímicas, com o objetivo de induzir propriedades físico-químicas, organolépticas e microbiológicas desejáveis no alimento ou bebida. Estes microrganismos são denominados de culturas “starter” ou cultivos iniciadores e as principais aplicações dos mesmos encontram-se nas indústrias de panificação, laticínios e bebidas alcoólicas.

Em produtos cárneos embutidos e conservas vegetais, a aplicação de cultivos iniciadores foi desenvolvida a partir da década de sessenta. Conforme Geisen, Lücke & Kröckel (1992) as primeiras referências na literatura para o uso microrganismos em carnes são: cepas de leveduras para a produção de salame desidratado foram pesquisadas por Cesari (1919) e Cesari *apud* Guillermond (1920); Kurk (1921) patenteou uma cepa de *Micrococcus* nitrato-redutora e não-patogênica, como cultivo iniciador; Niinivara (1955) também sugeriu o uso de *Micrococcus* como cultivo iniciador; e Nurmi (1966) recomendou uma combinação de *Lactobacillus plantarum* com *Micrococcus* como culturas para salame, considerando a indução de uma rápida queda de pH, sem inibição da cor e aroma do produto.

Os primeiros cultivos iniciadores cárneos, comercialmente disponíveis, foram feitos nos Estados Unidos da América em 1957, com a produção da cultura denominada *Pediococcus cerevisiae* – posteriormente renomeada para *Pediococcus acidilactici*. Na Europa, os primeiros cultivos iniciadores comercializados foram culturas de *Micrococcus*, em 1961. As condições climáticas e as características organolépticas desejadas justificaram o interesse da indústria norte-americana por bactérias lácticas, pela produção de ácidos, enquanto que na Europa o interesse premente foi por características de cor, aroma e sabor produzidas por *Micrococcus* (JESSEN, 1995).

No Brasil, grandes empresas que processam produtos cárneos fermentados, bem como indústrias que desenvolvem atividades com outros alimentos fermentados (principalmente derivados lácteos e bebidas) utilizam fermentos importados e/ou de origem/hábitat diferente do substrato e das condições locais de produção brasileira. Segundo Leroy, Verluyten & Vuyst (2006), as propriedades tecnológicas desejáveis de um fermento cárneo comercial quando aplicado para um determinado tipo de salame (em determinadas condições de ambiente e substrato), necessariamente não são as mesmas para outro produto em condições ambientais e de substrato diferentes. Neste contexto, justifica-se a importância de cultivos iniciadores isolados a partir da microbiota natural do alimento ao qual deverá ser processado e controlado o processo fermentativo.

Ao nível laboratorial, estudo desenvolvido por Sawitzki & Terra (2000) na Universidade Federal de Santa Maria/RS, observaram resultados satisfatórios para as propriedades organolépticas, físico-químicas e microbiológicas ao inocular salame tipo italiano com a cultura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolada a partir da microbiota natural de salames artesanais da Região Fronteira Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

## **1.2 Identidade e qualidade do salame – característico produto cárneo fermentado**

A legislação brasileira – anexo V da Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000 - Ministério da Agricultura e do Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária (BRASIL/MAPA, 2000), define salame como produto cárneo

industrializado obtido de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho, ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado. A designação do produto Salame poderá ser seguida ou não das expressões que caracterizam sua origem ou processo de obtenção, como, por exemplo: Salame Tipo Italiano, Salame Tipo Milano, Salame Tipo Hamburguês, Salame Tipo Friolano, Salame Tipo Calabrês, Salame Tipo Alemão, Salaminho ou outros. O preparo da massa de salames pode ser feito através de dois processos: utilizando-se moedor e misturadeira ou feito em “cutter” (PARDI *et al.*, 1996). As características das matérias-primas são de importância decisiva para a elaboração de embutidos crus. A carne deve ser de animais sadios e os embutidos crus deverão ser preparados com carne maturada e acidificados, com pH em torno de 5,4 a 5,8 (CORETTI, 1986).

De acordo com Pardi *et al.* (1996), embutidos crus maturados e dessecados, também denominados de fermentados, são aqueles que se submetem à dessecação parcial, cura e maturação, embutidos em envoltórios naturais ou artificiais, defumados ou não, conservados por um tempo maior e cujos exemplos típicos são o Salame Italiano, Milano e o Rio Grande. Para Townsend & Olson (1994), o termo curado vem a significar a adição de sal, nitratos e/ou nitritos à massa cárnea. Rust (1994) classifica o salame como produto embutido seco ou semi-seco, obtido de carne curada, que tem como característica ser fermentada e dessecada, servida a frio, podendo ser defumada antes da dessecação.

No processamento de embutidos crus, como no caso do salame, após a trituração da carne, adição de condimentos e sais de cura e embutimento da massa, segue-se a maturação, quando ocorre a exposição do produto em local apropriado, com temperatura, umidade ambiental e ventilação adequadas, ocorrendo a migração da água de seu interior para o exterior. Na maturação, ocorrem complexos fenômenos bioquímicos e microbiológicos os quais vão conferir a cor vermelha característica, a liga e a consistência da massa, bem como o aroma e o sabor do produto, desenvolvidos a partir de bactérias fermentadoras (CORETTI, 1986). A qualidade do produto cárneo fermentado, associada com o *flavour* e a segurança alimentar, é determinada pelas transformações bioquímicas de proteínas, lipídios e carboidratos, em

conseqüência da ação de enzimas endógenas da carne e de bactérias (Molly et al., 1997).

A microbiota que está estabelecida e que participa do fenômeno de fermentação e maturação do salame procede do ambiente e dos equipamentos usados na manufatura destes produtos quando usado o método mais tradicional e, de cultivos iniciadores, quando é utilizada tecnologia mais moderna (HIERRO, HOZ & ORDÓÑEZ, 1997). Segundo Buckenhüskes (1993), a fermentação natural e espontânea do salame é caracterizada pela ação de bactérias ácido lácticas, cocos Gram-positivos, catalase-positivos, bolores e leveduras. Também podem fazer parte da microbiota natural de salames microrganismos indesejáveis (deteriorantes, patogênicos e/ou toxigênicos), resultando em um produto de má qualidade ou que ofereça riscos à saúde do consumidor. Por esta razão, tem-se recomendado a adição de cultivos iniciadores na manufatura de vários tipos de salames fermentados, visando o controle e a padronização do processo fermentativo.

### 1.2.1 Qualidade do salame

O contínuo desenvolvimento técnico-científico e cultural, associado aos mecanismos de mídia e informação, resulta na demanda pela produção de alimentos com qualidade e menor custo de produção. A qualidade global de um alimento é determinada por diversos fatores ou parâmetros, incluindo características ou atributos de natureza físico-química, microbiológica, organoléptica e nutricional. As referidas características e atributos de qualidade do alimento resultam de um complexo sistema de controle da matéria-prima, dos ingredientes, das Boas Práticas de Fabricação – BPF, da tecnologia de produção, do envase/conservação, da comercialização e da logística de distribuição. Além da qualidade intrínseca do produto, a viabilidade econômica e a competitividade são elementos determinantes na conquista de mercado.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Salame (BRASIL/MAPA, 2000) prevê a seguinte composição do produto: a) ingredientes obrigatórios: carne suína (mínimo de 60%, exceto para o salame hamburguês cujo teor mínimo exigido é de 50%), toucinho, sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou

potássio; b) ingredientes opcionais: carne bovina, leite em pó, açúcares, maltodextrinas, proteínas lácteas, aditivos intencionais, vinho, condimentos, aromas e especiarias, substâncias glaceantes (revestimento externo); e c) coadjuvantes de tecnologia – cultivos iniciadores (*starter*). Os requisitos de características sensoriais são textura, cor, sabor e aroma característico.

As características físico-químicas devem estar de acordo com a designação do produto em seus respectivos regulamentos técnicos, considerando os seguintes valores máximos e mínimos aceitáveis: Atividade de água –  $A_w$ , máximo 0,92; umidade, máximo 40%; gordura, máximo 35%; proteína, mínimo 20% e carboidratos totais, máximo 4%. Os aditivos, coadjuvantes de tecnologia, critérios macroscópicos, microscópicos e microbiológicos seguem de acordo com a legislação vigente. Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo regulamento vigente (BRASIL/MAPA, 2000).

Quanto à qualidade microbiológica, o processamento do salame requer cuidados especiais, desde a matéria-prima até a armazenagem e consumo. Por ocasião do abate, a matéria-prima (carne) pode ser contaminada por microrganismos patogênicos, em contato com pêlos, pele, cascos, conteúdo do estômago e vísceras, equipamentos e utensílios utilizados, mãos e vestuários dos manipuladores, bem como a água utilizada na lavagem das carcaças. Segundo JAY (2005), a população de microrganismos freqüentemente encontrada em carnes frescas e aves são: os gêneros de bactérias *Vagococcus*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Campylobacter*, *Aeromonas* e *Acinetobacter*; os gêneros de fungos: *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Sporotricum*, *Thamnidium* e os gêneros de leveduras: *Cadida*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*.

A moagem ou trituração da carne é uma etapa do processamento dos embutidos que pode interferir na intensidade da contaminação microbiana, em razão de que é oportunizada maior superfície de contato da carne com o ambiente, possibilitando às bactérias que se encontram na superfície externa da carne se distribuir por todo o produto. A manipulação do produto, os equipamentos, condimentos e envoltório utilizados também devem ser tratados com cuidado higiênico-sanitário, de forma a oferecer o menor risco possível de

contaminação com microrganismos indesejáveis. De acordo com a especificidade do microrganismo e da interação com o alimento, poderá ocorrer a deterioração do alimento ou a intoxicação/infecção alimentar quando o alimento contaminado for ingerido (JAY, 2005). Os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* são microrganismos que oferecem risco para a segurança alimentar e o *S. aureus* tem sido responsável por intoxicação gastrointestinal devido a sua habilidade para se multiplicar e produzir enterotoxina durante a fase inicial de fermentação da matéria-prima carne (LEROY, VERLUYTEN & VUYST, 2006).

A matéria-prima utilizada na elaboração do salame apresenta fatores intrínsecos favoráveis ao desenvolvimento microbiano, exigindo rígido controle dos fatores extrínsecos na produção destes produtos. Ao considerar a possibilidade de contaminação por microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes é importante a avaliação microbiológica do produto, a qual dará indicações sobre a qualidade da matéria-prima utilizada, higiene e sanificação na manipulação e processamento, adequação das técnicas utilizadas na preservação do produto e eficiência das operações de transporte e armazenamento do produto final. Com a finalidade de evitar riscos à saúde do consumidor, foram estabelecidos critérios e limites microbiológicos para cada tipo de alimento, através de legislações específicas. Conforme a legislação brasileira, as condições microbiológicas para produtos cárneos maturados (presuntos crus, salames, lingüiças dessecadas, charque, “jerked beef” e similares) devem estar de acordo com os seguintes padrões: Coliformes a 45°C, a tolerância para a amostra indicativa e para cada uma das duas amostras em cinco amostras analisadas é de  $10^3$  UFC . g<sup>-1</sup>; *Staphylococcus* - coagulase positivo, a tolerância para a amostra indicativa e para uma amostra em cinco amostras analisadas é de  $5,0 \times 10^3$  UFC . g<sup>-1</sup>; *Salmonella* sp deve estar ausente tanto na amostra indicativa quanto nas cinco amostras analisadas (BRASIL/MS/ANVISA, 2001).

As características sensoriais do salame, identificadas pela cor, aroma, sabor e textura, são resultantes de complexas reações químicas entre a matéria-prima, os ingredientes e os aditivos, sob determinadas condições de processamento. Segundo Forrest et al. (1979), a adição de sais de cura, como nitratos e nitritos de sódio ou potássio, cloreto de sódio e de condimentos, tem efeito no produto em

relação à coloração, a proteção contra oxidação lipídica, à proteção antimicrobiana e ao aroma e sabor. O nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) é componente ativo na obtenção da coloração vermelha e sabor da carne curada enquanto o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é uma fonte de nitrito. Segundo Cammack et al. (1999), o nitrato é reduzido para nitrito por bactérias com atividade nitrato redutase sob condições anaeróbias e em pH ácido. O nitrito produz como intermediário o monóxido de nitrogênio (NO), que vai combinar-se com a mioglobina (contida no sarcoplasma das fibras do músculo estriado) e formar a mioglobina nitrosa. Esta apresenta cor rósea instável, e posteriormente, em face de acidificação, formará o hemocromo, responsável pela cor vermelha atraente dos produtos curados. As transformações químicas no processo de formação da cor dos produtos cárneos curados é exemplificada conforme a Figura 1:

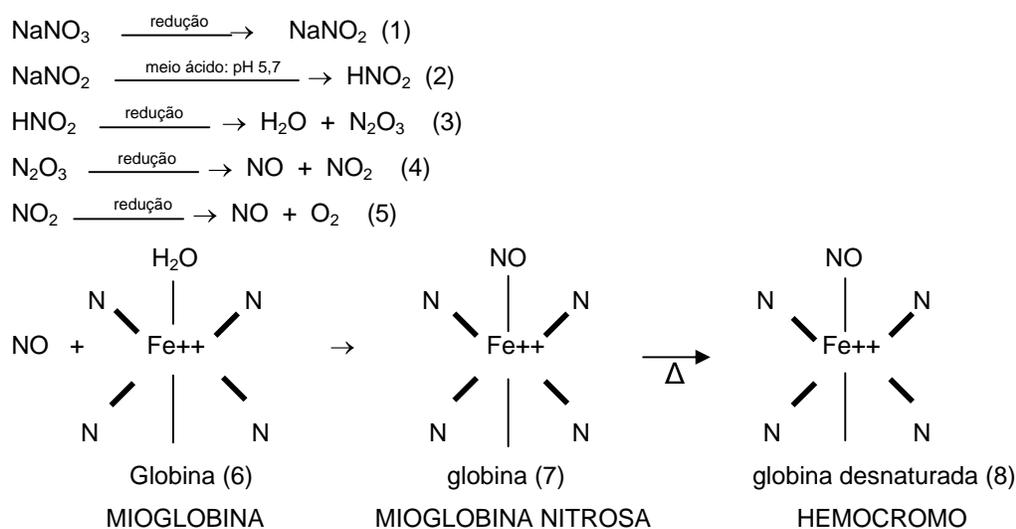


Figura 1: Seqüência de reações químicas, características da formação da cor dos produtos cárneos curados e cozidos.

Fonte: Forrest et al. (1979)

Siriken et al. (2006) citando Cassen et al. (1979) relata que a adição de nitrito em produtos cárneos inibe o desenvolvimento de *Clostridium botulinum*, funciona como um antioxidante, promove a cor vermelha característica do produto curado e um particular *flavor* no salame. A legislação brasileira (BRASIL/MS, 1998) limita em  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  a concentração máxima de nitrito e  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ , a concentração

máxima de nitrato em carnes e produtos cárneos, para que não seja colocada em risco a saúde da população exposta

O Nitrito (de sódio ou potássio) tem propriedade química oxi-redutora e a sua toxicidade está relacionada com seu poder oxidante, o qual tem a propriedade de oxidar a hemoglobina sangüínea, transformando-a em metahemoglobina com baixo potencial para transportar o oxigênio, causando danos aos tecidos do nosso organismo. Em organismos adultos, há um sistema enzimático (metahemoglobina redutase), capaz de reverter a formação da metahemoglobina, porém, em crianças essas enzimas específicas não existem e podem desencadear intoxicações graves, inclusive com conseqüências que podem levar à morte o indivíduo (GIRARD, et al., 1991). Segundo Hotchkiss (1988), citado por Toni et al. (1994), a restrição ao uso de nitrito em formulações de produtos cárneos está relacionada ao fato de que resíduo de nitrito, ao combinar-se com resíduos de proteínas, poderá formar nitrosaminas e/ou nitrosamidas, compostos potencialmente carcinogênicos. Embora o nitrito seja permitido em alimentos como agente preservativo, têm gerado preocupações sobre a segurança do mesmo, o qual em alta concentração é indubitavelmente tóxico para humanos: efeitos agudos têm sido observados pela ingestão acidental, por exemplo, de água contaminada, salames e medicamentos (BRADBERRY, GAZZARD & VALE, 1994; KENNEDY, SMITH & McWHINNEY, 1997 e GRUDZINSKI, 1991 citados por CAMMACK et al., 1999).

Outro importante promotor da qualidade do salame é o sal cloreto de sódio. Junto com a temperatura e o pH, são um dos maiores parâmetros que influenciam no crescimento e sobrevivência de bactérias (GUTIERREZ et al., 1995). Segundo Girard et al. (1991), o sal é o mais antigo aditivo utilizado em produto cárneos e desempenha múltiplas funções: a) tem ação bacteriostática na concentração de 10% no meio, mas na concentração de 5% não há mais esse efeito sobre microrganismos anaeróbios e, em concentrações a 3% ou próximas a esse percentual, é importante associar outro recurso para complementar a ação bacteriostática; b) é um agente de sapiez; c) tem poder de retenção da água da carne; d) é emulsificante e ligante (aumenta a solubilidade das proteínas musculares devido à sua força iônica); e e) tem ação oxidante de gorduras, o que é indesejável.

O aroma e o sabor da carne são características difíceis de serem diferenciadas de forma objetiva, levando-se a interpretação como um conjunto destas sensações: o *flavor*. Segundo Ordóñez, et al. (2005), os precursores essenciais do sabor de carne são compostos não-voláteis, solúveis em água e com peso molecular baixo, resultantes de subseqüentes reações enzimáticas de proteínas e de carboidratos a peptídeos, aminoácidos livres, mono e dissacarídeos e ácidos orgânicos. Contudo, o aroma específico de cada espécie cárnea é atribuído fundamentalmente a componentes voláteis de origem lipídica (hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos carbonílicos, ésteres, éteres, derivados do benzol, furano  $\gamma$  e  $\delta$ -lactonas, piranos, oxazonilas, pirróis, piridinas, pirazinas, tióis, sulfetos, tiofenos, tiazóis, tritiolanos, tritianos, ditiazinas, ditiolanos e ditianos. Alguns compostos foram qualificados com aroma tipo cárneo como é o caso de metional, 2 – folmiltiofeno, 5 – tiometilfurfural e 3, 5 – dimetil – 1,2,4 – tritioleño (Ordóñez, et al., 2005).

#### 1.2.1.1 Oxidação lipídica e implicações na qualidade do salame

Considera-se a oxidação lipídica em salames um dos aspectos mais significativos e necessário de ser discutido no contexto da qualidade do produto, porque a gordura é um dos componentes em maior proporção no salame e susceptível a reações químicas indesejáveis. Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Salame (BRASIL, 2000), é permitida a adição de gordura na composição do salame em até 35%. De acordo com as especificações contidas em rótulos dos salames produzidos e comercializados na região Sul do Brasil, a média é de 30% de gordura.

A gordura animal utilizada na fabricação do salame é proveniente de tecido adiposo de suíno, o qual, segundo Enser et al. (1995), apresenta uma média de 36,85% de ácidos graxos saturados, 17,5% de polinsaturados (destes, 14,2% são de C18:2 n-6 linoléico) e 41,53% de monoinsaturados (destes, 32,8% são de ácido graxo C18:1 n-9 oléico), não sendo detectada a presença de C18:1 trans. A percentagem de ácidos graxos insaturados e polinsaturados no salame tem interesse devido ao valor nutricional e, também, quanto ao risco de deterioração do alimento e produção de compostos tóxicos.

Os lipídios são importantes em nossa dieta, pois se constituem em fonte de energia para nosso organismo, atuando também como auxiliares na absorção de vitaminas e no desenvolvimento de tecidos. O *Institute of Medicine of the National Academies Press* recomenda que, do total de calorias ingeridas diariamente, sejam provenientes dos carboidratos 45 – 65%, das gorduras 20 – 30% e das proteínas 10 – 35%, visando atender às necessidades nutricionais diárias e minimizando os riscos de doenças crônicas (NATIONAL ACADEMIES PRESS, 2002). O referido estudo ressalva a importância dos ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados na redução da concentração de colesterol no sangue e na diminuição do risco de doenças cardiovasculares (a adequada ingestão diária de ácido linoléico é de 17g para homens e 12g para mulheres).

Fatores intrínsecos e extrínsecos ao processamento e maturação do salame sujeitam o mesmo à lipólise e oxidação lipídica. As lípases endógenas do tecido muscular e adiposo, assim como as de origem microbiana, têm importante função na hidrólise e no metabolismo de proteínas e lipídios durante a fermentação e maturação do salame, resultando em desejáveis compostos do aroma e sabor do produto (MOLLY et al., 1997). Entretanto, um excesso de oxidação lipídica pode atingir o nível de rancificação do alimento, com características organolépticas inaceitáveis e risco de presença de moléculas tóxicas ao nosso organismo (ZANARDI et al., 2004). Os ácidos graxos livres de cadeia longa polinsaturados e monoinsaturados são sensíveis à oxidação lipídica (COUTRON-GAMBOTTI & GANDEMER, 1999) e, quando oxidados, perdem sua funcionalidade no organismo, além da possibilidade de produção de compostos indesejáveis como pentanal, hexanal, 4 – hydroxynonenal e malonaldeído – MDA (PERSON et al., 1983; RAHARJO & SOFOS, 1993).

A auto-oxidação é o principal processo de oxidação lipídica em alimentos cárneos, cujos elementos propagadores da oxidação são os hidroperóxidos - ROOH (FERNÁNDEZ, PÉREZ-ÁLVAREZ & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 1996; GANDEMER, 2002). A peroxidação lipídica é um dos primeiros mecanismos de deterioração do alimento e, especialmente, dos produtos cárneos, com conseqüente implicação na qualidade do produto, manifestada pela transformação do sabor, da cor, da textura, do valor nutritivo e da produção de compostos tóxicos. Vários fatores interferem na peroxidação de lipídios em

produtos cárneos, desde a matéria-prima e condições ambientais até as condições de processamento e adição de compostos exógenos, como o sal, nitrito, especiarias e antioxidantes (KANNER, 1994).

Antioxidantes sintéticos têm sido utilizados para retardar o desenvolvimento da rancidez em produtos cárneos e estender a validade do produto. Os compostos fenólicos butil hidroxi-anisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT) e propil galato (PG), comumente usados, apresentam significativo poder antioxidante, mas, segundo Namique (1990), acredita-se que possuem atividade carcinogênica. Outros compostos, como ascorbatos, fosfatos, especiarias e nitritos, também têm sido usados na formulação do salame, como controladores/inibidores da oxidação lipídica. Conforme a estrutura química e respectiva ação no produto, o antioxidante pode atuar na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos (ARAÚJO, 1995). Radical peróxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidróxido ( $HO^-$ ), íon ferril ( $Fe^{4+}$ ) e íons metálicos livres, são estruturas químicas com potencial para iniciar a peroxidação lipídica (KANNER, 1994).

Segundo Zanardi et al. (2004), quanto testados cultivos iniciadores comerciais, aditivos e especiarias em salames, não se obteve perceptível efeito sobre a lipólise e a oxidação lipídica. Em outros estudos (Garcia et al., 1992; Molly et al., 1997 e HIERRO, HOZ & ORDÓÑEZ, 1997), foi observado um similar incremento de ácidos graxos livres entre as amostras de salames inoculadas com *Lactobacillus* e/ou *Micrococcus* e amostras produzidas em condições estéreis ou com antibiótico. As referências indicam a importância de estudos sobre a oxidação lipídica de ácidos graxos essenciais em salames em relação à atividade de cultivos iniciadores.

### 1.2.2 Cultivos iniciadores: importantes agentes promotores da qualidade do salame

O uso de cultivos iniciadores na produção de salames está se tornando necessário para garantir a segurança, unificar propriedades de produtos, incluindo sabor e cor consistentes, e diminuir o tempo de maturação (RANTSIOU et al., 2005). Cultivos iniciadores podem ser definidos como uma preparação microbiana

de um grande número de células de pelo menos um microrganismo, com vistas a ser acrescentado a uma matéria-prima e produzir um alimento fermentado, acelerando e controlando seu processo de fermentação (LEROY & VUYST, 2004).

Conforme Buckenhüskes (1993) citam-se alguns critérios gerais para a seleção de cultivos iniciadores para alimentos: a) segurança (o microrganismo não pode desenvolver qualquer atividade patogênica ou tóxica e a obtenção da cultura deve estar livre de condições higiênicas precárias, infecciosas ou substâncias indesejáveis); b) efetiva propriedade tecnológica (o microrganismo deve dominar a microbiota espontânea e produzir atividade metabólica desejada); c) aspectos econômicos (a produção deverá ser viável do ponto de vista econômico, ser preservada por congelamento ou liofilização com pequena perda de atividade, ter estabilidade/viabilidade por vários meses sob determinadas condições e a manipulação do microrganismo deve ser tão fácil quanto possível).

A adição de cultivos iniciadores em carnes pode ter diferentes propósitos: melhorar a segurança (inativação de microrganismos patogênicos); melhorar a estabilidade (extensão da vida de prateleira do alimento, inibindo transformações indesejáveis provocadas por microrganismos deteriorantes ou outras reações); prover a diversidade (modificação da matéria-prima para obter novas propriedades sensoriais do alimento) e prover benefícios à saúde (efeitos positivos na microbiota intestinal do consumidor) (LÜCKE, 2000). Cultivos iniciadores modernos são selecionados como simples ou múltiplas espécies de bactérias especificamente adaptadas para o substrato e a matéria-prima (HOLZAPFEL, 2002).

Na fabricação do salame, um importante aspecto é fabricar um produto com o padrão desejado de qualidade e no menor tempo possível, com o objetivo de reduzir custos na produção. Neste contexto, tem-se buscado alternativas para acelerar o processo de redução do pH (acidificação) e secagem do produto. Uma das alternativas é a adição de acidulantes químicos como a glucona delta lactona (GDL), mas o sabor e aroma originais do salame somente podem ser obtidos pela fermentação, com o uso de selecionados microrganismos como cultivos iniciadores (BUCKENHÜSKES, 1993).

Os componentes mais importantes dos cultivos iniciadores, em produtos cárneos crus, são as bactérias ácido lácticas e as *Micrococcaceae*, mas também fazem parte de cultivos iniciadores os bolores e as leveduras (HANS, 1994). Espécies de bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Pediococcus* têm ação acidificante, enquanto que espécies do gênero *Micrococcus* e *Staphylococcus* – coagulase negativa atuam na coloração, sabor e aroma dos produtos cárneos (GEISEN, LÜCKE & KRÖCKEL, 1992; TERRA, 1998). Salame inoculado com cultivos iniciadores compostos de selecionadas bactérias ácido lácticas homofermentativas, por exemplo, *Lactobacillus* e/ou *Pediococcus* e *Micrococcus* Gram-positivo, catalase-positivo, por exemplo, *Staphylococcus* e *Kokuria*, promovem a qualidade e segurança do produto final, padronizando o processo de produção (LEROY; VERLUYTEN & VUYST, 2006). No referido consórcio de microrganismos, as bactérias ácido lácticas têm função relevante, pois promovem a estabilidade microbiana e as propriedades tecnológicas desejáveis no produto final, em razão da produção dos ácidos láctico e acético, os quais promovem o decréscimo do pH do meio (DROSINOS et al., 2007).

O típico *flavour* do salame é resultado de complexas interações do catabolismo microbiano e de enzimas musculares (que degradam carboidratos, proteínas e lipídios), associadas às especiarias e agentes de cura, resultando no perfil sensorial do salame (ERKKILÄ et al., 2001; OLESEN, MEYER & STAHNKE, 2004; TJENER et al., 2003). Os estudos de compostos voláteis que compõem o aroma de salames fermentados apresentam vários grupos químicos de compostos, como os alcanos, alcenos, cetonas, aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, derivados sulfurosos, terpenos e, com menor importância química, os fenóis, cloretos e pirazinas (CHIZZOLINI, NOVELLI & ZANARDI, 1998).

Berdagué et al. (1993), em estudos realizados sobre os efeitos de cultivos iniciadores na formação de compostos do sabor em embutidos secos, concluiu que a natureza dos cultivos iniciadores tem significativa influência sobre a composição volátil e características sensoriais, contribuindo para o sabor dos mesmos. O referido estudo indica que o sabor da lingüiça pode ser modulado pela combinação da microbiota, sendo necessária a implementação de mais estudos sobre as interações bioquímicas entre cultivos iniciadores que desenvolvem o

sabor e os acidificantes. Conforme Ardo (2006), bactérias ácido lácticas têm importante ação no *flavour* do salame porque ao necessitarem de aminoácidos para sua sobrevivência desenvolvem atividade proteolítica. Culturas *Micrococaceae*, Gram-positivo, catalase-positivo e coagulase-negativo como as espécies de *Staphylococcus* e/ou *Kukuria*, contribuem para a formação do *flavour* devido à atividade das enzimas catalase e nitrato redutase, à degradação de carboidratos, ao catabolismo de aminoácidos e da  $\beta$  - oxidação de ácidos graxos (TJENER et al., 2003; LEROY, VERLUYTEN & VUYST, 2006).

Segundo Hagen et al. (1996), a proteinase do *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* NCDO 151, adicionada em embutido seco, acelerou a maturação do mesmo, quando se obteve elevada pontuação na análise sensorial (sabor, aroma, cor e textura) apresentando a maturação em quatorze dias equivalente ao período de maturação de vinte e oito dias dos demais embutidos (não-adicionados de enzimas ou com adição de enzima alcalase).

As bactérias ácido lácticas têm um maior potencial para uso em biopreservação porque elas são saudáveis para o consumidor, dominam a microbiota natural durante a estocagem de muitos alimentos e, igualmente, são hábeis em inibir indesejáveis microrganismos, como, a *Listeria monocytogenes* (ALVES et al., 2006).

Conforme Smith & Palumbo (1983), a adição de um elevado número ( $10^7$  -  $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> de produto) destas bactérias inibirá o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, prevenindo ou reduzindo falhas na fermentação. Na manufatura de determinado tipo de salame, Smith & Palumbo (1983), citam que Masters et al. (1981) observou que *Salmonella newport* e *Salmonella typhimurium* eram completamente eliminadas pelo uso de uma cultura de *L. plantarum*. Segundo Lücke (2000), os principais mecanismos pelos quais as bactérias ácido lácticas agem sobre seus competidores são a produção de ácido láctico, ácido acético e bacteriocinas. Alguns outros metabólitos de bactérias ácido lácticas têm apresentado inibição de bactérias Gram-negativas *in vitro*, mas é improvável que estes compostos sejam explorados para melhorar a segurança e estabilidade de carnes.

Bactérias ácido lácticas bacteriogênicas têm apresentado efetiva inibição do desenvolvimento de microrganismos patógenos, como, a *Listeria monocytogenes*,

*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium difficile*, sob determinadas condições (HOLZAPFEL, GEISEN & SCHILLINGER, 1995). Conforme Papamanoli et al. (2003), de sete culturas de *L. plantarum* isolados a partir da microbiota natural de salames, 71% apresentaram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, 29% inibiram duas culturas de *Staphylococcus aureus*, mas não houve inibição de *Escherichia coli* 0157: H7 e *Bacillus cereus*. Salames produzidos com cultivos iniciadores comerciais inibiram o desenvolvimento de *L. monocytogenes* em 21 dias de maturação, enquanto que a adição dos cultivos iniciadores *L. rhamnosus* E-97800, *L. rhamnosus* LC -705 e *L. plantarum* ALCO1, apresentaram adicional atividade antilisterial em determinado salame Norte Europeu com 14 dias de maturação (TYÖPPÖNEN et al., 2003). Neste contexto, ressalva-se a importância de contínuos estudos de culturas com atividade bacteriogênicas e de culturas pró- bióticas em salames.

### **1.3 Bactérias ácido lácticas em produtos cárneos fermentados**

Fazem parte do grupo das bactérias ácido lácticas os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Vagococcus*. As bactérias ácido lácticas podem ainda ser divididas em dois grandes grupos: as homofermentativas, aquelas que produzem ácido láctico como produto principal ou único da fermentação da glucose, e heterofermentativas, aquelas que produzem quantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono e etanol a partir da glucose. São exemplos de bactérias homofermentativas aquelas pertencentes aos gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e algumas espécies de *Lactobacillus*. Os gêneros *Leuconostoc*, *Carnobacterium* e algumas espécies de *Lactobacillus*, são exemplos de espécies heterofermentativas (JAY, 2005). Comercialmente, bactérias ácido lácticas produzidas como cultivos iniciadores poderão conter as espécies de *Lactobacillus plantarum*, *L. sake*, *L. curvatus*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* (HANS, 1994).

A microbiota lactobacilar, predominante em embutidos crus, no salame, por exemplo, se caracteriza basicamente por microrganismos fermentativos, preferencialmente formadores de ácido láctico. Uma combinação de

*Enterococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc* e, sobretudo *Pediococcus*, desdobra reservas de carboidratos dos músculos e, também, dos aditivos, transformando-os na acidez característica dos embutidos crus maturados. Leveduras também participam do processo, em especial a espécie *Debaryomyces hansenii* (HANS, 1994). Segundo Terra (1998), o processo fermentativo do salame ocupa posição de relevância, pois participa diretamente na definição da cor, sabor, textura e vida útil do produto.

Quanto às exigências de crescimento, as bactérias ácido lácticas necessitam de aminoácidos pré-formados, vitaminas do complexo B, bases purinas e pirimidinas. São mesófilas, algumas crescem sob temperaturas inferiores a 5°C e outras a temperaturas elevadas, como 45°C. Quanto ao pH, são capazes de crescer entre valores de pH 3,2 e 9,6, sendo que a maioria cresce entre 4,0 e 4,5. Estas bactérias apresentam limitada ação proteolítica e lipolítica.

Em tempos passados, a taxonomia das bactérias ácido lácticas baseava-se na reação de Gram, catalase negativo e na produção de ácido láctico de uma determinada configuração, juntamente com a capacidade de fermentar determinados carboidratos. Atualmente, usa-se a seqüência do rRNA, a composição de bases do DNA, a homologia do DNA, o tipo de peptidoglicano da parede celular e a especificidade imunológica de suas enzimas (JAY, 2005).

### 1.3.1 Bactérias ácido lácticas - Gênero *Lactobacillus*

As espécies mais comuns de *Lactobacillus* encontradas em produtos cárneos fermentados são *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. farciminis*, *L. alimentarius* e *Lactobacillus atípicos*. Estes últimos, posteriormente identificados como *L. sake* e *L. curvatus* (KANDLER & WEISS, 1986).

O gênero *Lactobacillus* caracteriza-se por apresentar células longas e delgadas, às vezes bastões curtos e curvos, muitas vezes na forma de *Cocobacillus*. Apresentam rara mobilidade, não esporogênicos e Gram-positivos. Metabolismo fermentativo, obrigatoriamente sacarolítico, ao menos metade do produto formado é lactato, podendo ser formados outros produtos como o etanol, dióxido de carbono, formiato e succinato. Ácidos voláteis com mais de dois carbonos não são produzidos. São microaerofílicos, desenvolvem-se em meio

sólido, geralmente em condições de anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio e 5 – 10% de CO<sub>2</sub>. Incomum redução de nitrato, se presente, somente quando o pH final é 6,0. Não hidrolisam gelatina. Indol e H<sub>2</sub>S não são produzidos. Somente algumas das espécies hidrolisam arginina, formando amônia (NH<sub>3</sub>). Rara produção de pigmento. Complexo nutricional requerido: aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sais, ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos e carboidratos fermentáveis. Desenvolvem-se em temperaturas entre 2 – 53°C, com temperatura ótima geralmente de 30 – 40°C. Acidúricos, com pH ótimo geralmente 5,5 – 6,2. Desenvolvem-se melhor em meio ácido fraco com pH inicial 6,4 – 4,5, cessando seu desenvolvimento quando pH 4,0 – 3,6 é atingido, dependendo da espécie e cepa (KANDLER & WEISS,1986).

Considerado as propriedades dos lactobacilos e das bactérias ácido lácticas, as indústrias, principalmente as de laticínios e de grande porte, utilizam estes microrganismos na produção de alimentos, sendo um mercado promissor e em crescente desenvolvimento.

#### **1.4 Cultivos iniciadores: uma oportunidade para o desenvolvimento do setor alimentício brasileiro**

A produção de alimentos no Brasil e no mundo será orientada, entre outros fatores, pela demanda de alimentos promotores de saúde e de significativo valor agregado, como, por exemplo, alimentos que são processados utilizando a fermentação como recurso biotecnológico. Os alimentos com destaque neste cenário são aqueles com propriedades pró-bióticas, seguros e com desejáveis propriedades organolépticas.

Conforme o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA e Assessoria de Gestão Estratégica – AGE (2006), o desenvolvimento socioeconômico, mundial e brasileiro, será pautado por algumas tendências, como: o significativo aumento demográfico e concentração da população em sistema urbano; o crescimento superior a 3% ao ano da economia e deverá ocorrer a liberalização do comércio internacional com a queda de barreiras tarifárias e não tarifárias para produtos agrícolas. Além destas tendências, os

avanços da biotecnologia estão transformando os mercados e ampliando as oportunidades na agricultura e na bioindústria.

As referidas tendências nos sugerem que um dos desafios da produção brasileira de alimentos é incorporar e prover as inovações científicas, tecnológicas e biotecnológicas ao agronegócio brasileiro. Neste contexto, o conhecimento da biodiversidade microbiana, o domínio tecnológico da obtenção das culturas e a aplicação/avaliação das mesmas nos alimentos ou em outros sistemas de produção, constituem-se como aporte para a promoção do desenvolvimento socioeconômico do setor. Ressalva-se que o referido aporte, implica em políticas e estratégias governamentais e não-governamentais de fomento à sustentabilidade do sistema, garantido o conhecimento técnico-científico, a tecnologia, o acesso, a segurança e a qualidade do alimento à população.

## Referências

4. ALVES, V. F. et al. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. *Meat Science*, v. 74, p. 623 – 627, 2006.
5. ANDRIGHETTO, C.; ZAMPESE, I. e LOMBARDI, A. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, p. 26 - 30, 2001.
6. ARAÚJO, J. M. A. *Química de alimentos: Teoria e Prática*. Viçosa: UFV, 1995. 335p.
7. ARDÖ, Ylva. *Flavour* formation by amino acid catabolism. *Biotchnology Advances*, v. 24, p. 238 – 242, 2006.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA/ Assessoria de Gestão Estratégica - AGE. *Projeções do agronegócio*, 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em 14 de abril 2006.
9. \_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA/ Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 22 de 31 de julho de 2000: Anexo V – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de

Salame. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis>>. Acesso em 14 de abril 2006.

10. \_\_\_\_\_Ministério da Saúde - MS. Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS. Portaria Nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos", constante do Anexo desta Portaria. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 14 dez., 1998. Seção I, p. 28.
11. \_\_\_\_\_Ministério da Saúde - MS/Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução Nº 12 de 02 de janeiro de 2001 – Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br/e-legis> > Acesso em 06 de março de 2006.
12. BERDAGUÉ, J. I. et al. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Science*, v. 35, p. 275 - 287, 1993.
13. BRADBERRY, S. M.; GAZZARD, B.; VALE, J. A. Methemoglobinemia caused by the accidental contamination of drinking water with sodium nitrite. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, v. 32, p. 173 – 178, 1994.
14. BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 12, p. 253 – 272, 1993.
15. CAMMACK, R. et al. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1411, p. 475 – 488, 1999.
16. CASSENS, R. G. et al. Reactions of nitrite in meat. *Food Technology*, v. 33, p. 45, 1979.
17. CHIZZOLINI, R.; NOVELLI, E.; ZANARDI, E. Oxidation in traditional Mediterranean meat products. *Meat Science*, v. 49, p. S87 – S99, 1998.
18. CORETTI, K. *Embutidos: Elaboración y defectos*. Zaragoza (Espanha): Acribia, 1986. 137p.
19. COUTRON-GAMBOTTI, C.; GANDEMER, G. Lipolysis and oxidation in subcutaneous adipose tissue during dry-cured ham processing. *Food Chemistry*, v. 64, p. 95 – 101, 1999.

20. DROSINOS, E. H. et al. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, v. 24, p. 260 – 270, 2007.
21. GANDEMER, G. Lipids in muscles and adipose tissues, changes, during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, v. 62, p. 309 – 321, 2002.
22. GIRARD, J. P. et al. *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. Zaragoza (Espanha): Acribia, 1991. 300p.
23. ENSER, M. et al. Fatty acid content and composition of english beef, lamb and pork at retail. *Meat Science*, v. 42, p. 443 - 456, 1996.
24. ERKKILÄ, S. et al. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. *Meat Science*, v. 58, p. 111 – 116, 2001.
25. FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Animal Production and Health Division*. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>>. Acesso em 06 de março de 2006.
26. FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, v.59, n. 3, p. 345 – 353, 1997.
27. FORREST, J. C., et al. *Fundamentos de ciencia de la Carne*. Zaragoza (Espanha): Acribia, 1979. 357p.
28. GARCIA, M. L. et al. Microorganisms and lipolysis in the ripening of dry fermented sausages. *International Journal Food Science and Technology*. v. 27, p. 675 – 682, 1992.
29. GEISEN, R.; LÜCKE, F.; KRÖCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch*, v. 72, n. 6, p. 894 - 898, 1992.
30. GRUDZINSKI, I. Studies on the mechanism of the toxic action of sodium nitrite on intestinal absorption in rats. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, v. 21, p. 475 – 479, 1991.
31. HANS, J. S. Microbiologia de los productos cárnicos. In: PRANDL, O. FISCHER, A. SCHIMIDTHOFER. *Tecnología e higiene de la carne*. Zaragoza (Espanha): Acribia, p. 641 - 667, 1994.

32. HIERRO, E.; HOZ, L. de la; ORDÓÑEZ, J. A. Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the lipolysis of dry fermented sausages. *Journal Agric. Food Chemistry*, v. 45, p. 2989 – 2995, 1997.
33. HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of food Microbiology*, v.75, p. 197 – 212, 2002.
34. HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of food Microbiology*, v. 24, p. 343 – 362, 1995.
35. HOTCHKISS, J. H. Nitrate, nitrite and nitroso compounds in foods. *Food Technology*, v. 40, n. 30, p. 100 - 105, 1988.
36. HAGEN, B. F. et al. Bacterial proteinase reduces maturation time of dry fermented sausage. *Journal of Food Science*, v. 6, n. 5, p. 1024 – 1029, 1996.
37. JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Traduzido por Tondo, E. C. et al. Porto Alegre: Artemed, 2005. 711p.
38. JESSEN, B. Starter cultures for meat fermentations. In: Campbell-Plat, G.; COOK, P.E. *Fermented meats*. London: Blackie Academe Professional, 1995. p. 130 – 159.
39. KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. *Meat science*, v. 36, p. 169 – 189, 1994.
40. KENNEDY, N.; SMITH, C. P.; MC WHINNEY, P. Faulty sausage production causing methaemoglobinaemia. *Archives of disease in Childhood*, v. 76, p. 367 – 368, 1997.
41. KLANDER, O., WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: HOLT, J. G. (editor-in-Chief) et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v.2, Baltimore: Williams & Wilkins , 1986. p. 1208 – 1234
42. LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; VUYST, L. D. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v.106, p. 270 – 285, 2006.
43. LEROY F.; VUYST, L. D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, v.15, p. 67 - 78, 2004.

44. LÜCKE, F-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, v. 56, p. 105 – 115, 2000.
45. MASTERS, B. A. et al. Fate of *Salmonella newport* and *Salmonella typhimurium* inoculated into summer sausage. *Journal of Food Protection*, v. 44, p. 527 - 530, 1981.
46. MOLLY, K. et al. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages: first results of a European project. *Food Chemistry*, v. 59, n. 4, p. 539 – 545, 1997.
47. NATIONAL ACADEMIES PRESS. Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, fiber, Fat, Fatty Acids, cholesterol, Protein and Amino Acids*. Setembro de 2002. Disponível em: <<http://www.iom.edu/CMS/3788/4576/4340.aspx>> Acesso em 14 de março de 2004.
48. NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, v. 29, p. 273 – 300, 1990.
49. OLESEN, P. T.; MEYER, A. S.; STAHNKE, L. Generation of flavour compounds in fermented sausages – the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, v. 66, p. 675 – 687, 2004.
50. ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnologia de alimentos: Alimentos de origem animal*. Traduzido por Murad, F. Porto Alegre: Artmed, 2005. 280p.
51. PAPAMANOLI, E. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, v. 65, p. 859 – 867, 2003.
52. PARDI, M. C. et al. *Ciência, higiene e tecnologia da carne*. Goiânia: CEGRAF/UFG, v.2, 1996. 1110p.
53. PELCZAR JUNIOR, M. J. et al. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. Traduzido por Yamada, S. F. et al. 2. ed., v.2, São Paulo: Makron Books, 1997. 1072p.
54. PEARSON, A. M. et al. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. *Food Technology*, v. 31, p. 1338 – 1342, 1983.
55. PEDERSON, C. S. *Microbiology of food fermentation*. Westport, CT: AVI, 1971. 384 p.

56. RANTSIOU, K. et al. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*, v. 22, p. 19 – 28, 2005.
57. RUST, R. E. Productos embutidos. In: PRICE, J. F., SCHWEIGERT, B. S. *Ciencia de La Carne y de Productos Carnicos*. 2. ed. Zaragoza (Espanha): Acríbia, 1994. p. 415 – 439.
58. SAWITZKI, M. C.; TERRA, N.N. (orientador). Caracterização de bactérias ácido lácticas isoladas de salames artesanais e aplicadas como cultivos iniciadores em salame tipo italiano. Santa Maria: UFSM, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, 2000.
59. SIRIKEN, B. et al. The microbiological quality and residual nitrate/nitrite levels in turkish sausage (*soudjouck*) produced in Afyon Province, Turkey. *Food Control*, v.17, p. 923 – 928, 2006.
60. TJENER, K. et al. A fermented meat model system for studies of microbial aroma formation. *Meat Science*, v. 66, p. 211 – 218, 2003.
61. SMITH, J. L.; PALUMBO, S. A. Use of starter cultures in meats. *Journal of Food Protection*, v. 46, n. 11, p. 997 - 1006, 1983.
62. STEINFELD, H. Economic constraints on production and consumption of animal source foods for nutrition in developing countries. *Journal of Nutrition Online*, 133: 4054S - 4061S, 2003. Disponível em: <<http://www.nutrition.org/cgi/reprint.htm> > Acesso em 06 de março de 2006.
63. TERRA, N. N. *Apontamentos de tecnologia de carnes*. São Leopoldo: UNISINOS, 1998. 216 p.
64. TONI, C. H. et al. Uso de bactérias lácticas e seus efeitos nas variações do pH e nitrito durante a maturação do salame tipo italiano. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimento*, v. 28, n. 1, p. 1 – 9, 1994.
65. TOWNSEND, W.E., OLSON, D.G. Las carnes curadas y su processado. In: PRICE, J.F., SCHWEIGERT, B.S. *Ciencia de la carne y de productos carnicos*. 2. ed. Zaragoza (Espanha): Acríbia, 1994. 581 p.
66. TYÖPPÖNEN, S. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. *Food Control*, v.14, p. 181 – 185, 2003.

67. ZANARDI, E. et al. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*, v. 66, p. 415 – 423, 2004.
68. WARD, Owen P. *Biotechnologia de la fermentacion*. Zaragoza (Espanha): Acríbia, 1989. 275 p.

**Caracterização fenotípica e por PCR espécie-específica de linhagens promissoras como cultivos iniciadores de *Lactobacillus plantarum* isolados de salames artesanais fermentados naturalmente**

Maristela Cortez Sawitzki<sup>1</sup>, Ângela Maria Fiorentini<sup>1,2</sup>, Fábio Cristiano Angonesi Brod<sup>1</sup>,  
Caroline Tagliari<sup>1</sup>, Teresinha Marisa Bertol<sup>3</sup>, Ana Carolina Maisonnave Arisi<sup>1</sup>,  
Ernani Sebastião Sant'Anna<sup>1</sup>

Publicado por *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 547 – 552, 2007.

**RESUMO**

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar culturas promissoras como cultivos iniciadores, de *Lactobacillus plantarum* isoladas de salames artesanais, fermentados naturalmente, produzidos na região Noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Das 127 bactérias ácido lácticas homofermentativas, Gram-positivas e catalase-negativas isoladas, dez foram aleatoriamente selecionadas e realizadas sua caracterização fenotípica e PCR espécie-específica foram realizadas. O DNA genômico das culturas isoladas e das culturas de referência *L. plantarum* ATCC 8014 e *L. pentosus* ATCC 8041 foi amplificado utilizando-se dois pares de iniciadores espécie-específicos para *L. plantarum* (16/Lpl e LbP11/LbP12). Os resultados da caracterização fenotípica e da PCR espécie-específica permitiram a identificação como *Lactobacillus plantarum* de sete culturas das dez selecionadas.

**Palavras-chave:** salame; *L. plantarum*; caracterização fenotípica; PCR

**ABSTRACT**

The purpose of the present work was to characterize promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented artisanal sausage manufactured in the northwestern region of Rio Grande do Sul state, Brazil. From 127 isolates of lactic acid bacteria homofermentative, Gram-positive, catalase-negative isolates, ten isolates were randomly selected and the phenotypic characterization and species-specific PCR were performed. Genomic DNA from each isolated strain and from the reference strains *L. plantarum* ATCC 8014 and *L. pentosus* ATCC 8041 were amplified using two pairs of *L. plantarum* species-specific primers (16/Lpl and LbP11/LbP12). The results of the phenotypic characterization and species-specific PCR allowed identification as *Lactobacillus plantarum* of seven strains from the ten selected ones.

**Key-words:** sausage; *L. plantarum*; phenotypic characterization; PCR

---

<sup>1</sup> Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, CEP: 880034-001 - Florianópolis, SC – Brasil.

<sup>2</sup> Depto. de Biologia e Química, UNIJUÍ, RS 344, km 39, CEP: 98.900-000 - Santa Rosa, RS – Brasil.

<sup>3</sup> EMBRAPA SUÍNOS e AVES. BR 153 km 110, Vila Tamanduá, CEP: 89.700-000 – Concórdia, SC – Brasil.

## 1 Introdução

A moderna biotecnologia de alimentos é uma evolução do antigo modo empírico de fermentação de alimentos. A adição de microrganismos desejáveis (cultivos iniciadores) em produtos cárneos atende aos diferentes propósitos: promover a segurança alimentar (inativação de microrganismos patogênicos ou toxigênicos), melhorar a estabilidade (extensão da vida de prateleira do produto, inibindo mudanças indesejáveis provocadas por microrganismos deteriorantes ou reações de abióticas), prover diversidade (modificação da matéria-prima para obter novas propriedades sensoriais) e prover benefícios à saúde por efeitos positivos na microbiota intestinal (LÜCKE, 2000). Um cultivo iniciador pode ser definido como uma preparação microbiana que contém um grande número de células, de pelo menos um tipo de microrganismo, para ser acrescentado a uma matéria-prima e produzir um produto fermentado, acelerando e controlando o processo de fermentação (LEROY & VUYST, 2004).

Conforme Drosinos et al. (2007), geralmente cultivos iniciadores consistem de bactérias ácido lácticas Gram-positivas, catalase-negativas, cocos (*Staphylococcus*, *Kocuria*), leveduras e mofo, dependendo do tipo de salame fermentado. As bactérias ácido lácticas desempenham o principal papel neste consórcio porque afetam as propriedades tecnológicas e a estabilidade microbiológica do produto final pela produção dos ácidos láctico e acético e conseqüente decréscimo do pH do meio. Uma exigência adicional de um cultivo iniciador ou cultura protetora é a sua contribuição para as mudanças desejáveis nos produtos cárneos, as quais podem ser mais bem desenvolvidas pelos cultivos iniciadores do que pela natural microbiota presente na carne. A redução do pH pelas bactérias ácido lácticas é um exemplo dessas transformações desejáveis (GEISEN, LÜCKE & KRÖCKEL, 1992).

A habilidade das bactérias ácido lácticas, em particular os *Lactobacillus*, para reduzir o pH e produzir bacteriocinas, previne o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, melhorando a segurança e conservação do produto cárneo (AMMOR et al., 2005b; BROMBERG et al., 2004; DEJENANE et al., 2005; FIORENTINI et al., 2001; LÜCKE, 1985; MACIEL, et al., 2003; SAMELIS, et al., 1994).

Entre os *Lactobacillus*, *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. plantarum* são as espécies mais comumente isoladas de produtos cárneos naturalmente fermentados (AMMOR et al., 2005a, 2005b; AYMERICH et al., 2003; DROSINOS et al., 2007; PARENTE, GRIEGO & CRUDELE, 2001; RANTSIOU, 2005; VOGEL et al., 1993). Entretanto, a fermentação cárnea pela microbiota natural ácido láctica pode, algumas vezes, resultar em produtos de pior qualidade e, por essa razão, a adição de cultivos iniciadores tem sido recomendada, se estabelecendo como prática comum na fabricação de vários tipos de salames fermentados (HOLZAPFEL, 2002; ANDRIGUETTO, ZAMPESE & LOMBARDI, 2001).

Na fabricação de tradicionais salames, é importante o uso de cultivos iniciadores constituídos de *Lactobacillus* isolados a partir de produtos locais, porque esses microrganismos estão bem adaptados para o produto e para a tecnologia específica de produção, contribuindo para a geração do tradicional *flavor* do produto cárneo (ANDRIGUETTO, ZAMPESE & LOMBARDI, 2001). Com base no exposto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar culturas de *Lactobacillus plantarum* isoladas de salames artesanais naturalmente fermentados, produzidos na região Fronteira Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil, como um primeiro estágio para investigar as propriedades tecnológicas (como cultivo iniciador) de bactérias ácido lácticas isoladas a partir de produtos regionais locais.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Culturas bacterianas e condições de desenvolvimento**

Com o objetivo de obter algumas culturas promissoras como cultivos iniciadores, somente dez culturas (codificadas como AJ2, AL2, AB4, R2, AP3, C5, AF5, AD3, N3 e AM2) foram selecionadas aleatoriamente (por sorteio) a partir de 127 culturas de bactérias ácido lácticas, Gram-positivas e catalase-negativas. As referidas culturas foram obtidas de um total de 168 culturas de bactérias ácido lácticas isoladas de 42 amostras de salames artesanais, em período médio de 7 dias de fermentação, fabricados sem a adição de cultivos iniciadores, em 21

diferentes locais de produção (sistema caseiro e artesanal), na região Fronteira Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

Considerando que, em uma primeira avaliação fenotípica, dos dez cultivos de bactérias ácido lácticas isoladas, cinco foram caracterizados como *Lactobacillus plantarum* e um como *Lactobacillus pentosus*, foram adquiridas as culturas de referência *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e *Lactobacillus pentosus* ATCC 8041 da Coleção Fundação André Tosello. Todas as culturas foram desenvolvidas em agar MRS e incubadas anaerobicamente a 37°C por 48h. Após incubação, uma alçada de cada cultura bacteriana desenvolvida sobre o agar MRS foi novamente inoculada em 10mL de caldo MRS e incubada a 37°C por 24h. Ao caldo com a cultura desenvolvida, foi adicionado glicerol (20%), como crioprotetor, congelado e estocado a - 80 °C.

## 2.2 Caracterização fenotípica

As dez culturas isoladas e as culturas de referência foram testadas quanto à produção de gás a partir da glicose em caldo MRS (modificado com adição de 2% de glicose e sem citrato de triamônio), contendo tubo de Durham e incubado a 37°C por 48h; atividade de catalase; coloração de Gram e morfologia celular observada usando um microscópio ótico (SCHILLINGER & LÜCKE, 1987).

O desenvolvimento das culturas em diferentes temperaturas foi observado sobre agar MRS após 3 dias de incubação a 8°C e 45°C, respectivamente. O desenvolvimento em diferentes valores de pH foi observado após 3 dias de incubação a 37°C em agar MRS, condicionado com HCl (1M) para pH 3,9 e com NaOH (1M) para pH 9,6. O desenvolvimento em diferentes concentrações de sal foi observado após 3 dias de incubação a 37°C em MRS, adicionado com 7% e 10% de NaCl.

Para o teste de fermentação de carboidratos, uma alçada de cada cultura isolada e de cada cultura de referência desenvolvida sobre agar MRS (incubada a 37°C por 48h) foi suspensa no meio de cultura API 50 CHL (API systems, BioMérieux). Usando uma pipeta esterilizada, a suspensão bacteriana foi homogeneizada e distribuída em cada um dos 50 microtubos da galeria API 50CH (numerados de 0 a 49), que contêm os respectivos substratos para o estudo do

perfil fermentativo da cultura. Todos os microtubos foram recobertos com óleo de parafina estéril para fins de anaerobiose e incubados a 37°C. A alteração da cor violeta do meio de cultura foi monitorada durante cinco dias de incubação, com a seguinte interpretação: Teste positivo (+) demonstrado pela transformação da cor violeta para amarela; negativo (-), sem transformação da cor violeta e duvidoso (?) para outra cor demonstrada. O primeiro microtubo (sem substrato) serviu como controle. A hidrólise de esculina foi demonstrada pela alteração da cor verde para preto e representada por um sinal positivo enquanto que um sinal negativo representou a não-ocorrência da alteração na cor do meio de cultura.

### 2.3 Isolamento do DNA bacteriano

As culturas de referência (*L. plantarum* ATCC 8014 e *L. pentosus* ATCC 8041) e as dez culturas identificadas na avaliação fenotípica foram selecionadas para análises da Reação da Polimerase em Cadeia – PCR. Uma alíquota de 1,0 mL de cada cultura (incubada por 12h em caldo MRS a 37°C) foi centrifugada a 13.000 x g por 2 min e, assim, foi obtida a massa celular bacteriana. O DNA bacteriano foi isolado utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), conforme manual técnico do fabricante e protocolo para isolamento do DNA genômico de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O referido protocolo foi adaptado com a adição de mutanolisina para auxiliar na lise celular conforme descrito por Quere, Deschamps & Urdaci (1997).

### 2.4 Iniciadores e condições da PCR

Considerando-se a análise fenotípica dos dez cultivos de bactérias ácido lácticas isoladas, desenvolveu-se a caracterização molecular utilizando iniciadores específicos para *L. plantarum* e *L. pentosus*. Também foi considerada a significativa similaridade do DNA genômico entre as espécies *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus* e foram utilizados iniciadores específicos conforme descrito por Berthier & Ehrlich (1998) e Quere, Deschamps & Urdaci (1997). Para a amplificação dos segmentos do DNA genômico de cada cultura, utilizou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase - PCR.

Dois pares de iniciadores (Invitrogen) foram utilizados para identificar *L. plantarum*. A identificação PCR espécie-específica de *L. plantarum* foi realizada usando os iniciadores LbP11 (5'AATTGAGGCAGCTGGCCA3') e LbP12 (5'GATTACGGGAGTCCAAGC3'), conforme Quere, Deschamps & Urdaci (1997) ou os iniciadores 16 (5'GCTGGATCACCTCCTTTC3') e Lpl (5'ATGAGGTATTCAACTTATG3'), conforme Berthier & Ehrlich (1998). A identificação PCR espécie-específica de *L. pentosus* foi realizada usando os iniciadores 16 (5'GCTGGATCACCTCCTTTC3') e Lpe (5'GTATTCAACTTATTAGAACG3'), conforme Berthier & Ehrlich (1998).

Para a PCR foram preparados 25 µL da mistura de reação, contendo 80 ng de DNA bacteriano, 0,5 µM de cada iniciador e 10 µL do Eppendorf Master Mix (2,5x) (Eppendorf), cuja concentração final na reação de PCR corresponde a 1,25 U de Taq DNA Polimerase, 50 mM de KCl, 30 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 mM de Mg<sup>2+</sup>, 0,1% Igepal-CA630 e 200 µM de cada dNTP (oligonucleotídeos). Os microtubos foram colocados em um termociclador (Minicycler™ - MJ Research, Inc. Watertown, MA) e as amplificações foram realizadas com as seguintes condições: para os iniciadores 16/Lpl e 16/Lpe, desnaturação a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 53°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos (BERTHIER & EHRLICH, 1998). Para os iniciadores LbP11/LbP12, desnaturação a 95°C por 5 minutos, 45 ciclos a 94°C por 30 segundos, 54°C por 1 minuto, 72°C for 1 minuto e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos (QUERE, DESCHAMPS & URDACI, 1997).

Após a amplificação por PCR, 15 µL de cada produto da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2,5%) por 50 minutos a 80 V em TEB (tris-borate-EDTA) e corados com brometo de etídio. Fragmentos de DNA de peso molecular igual 50 bp foram usados como padrões de peso de DNA molecular (DNA Ladder – Promega). O tamanho dos fragmentos amplificados foi visualizado em transluminador ultravioleta. Cada perfil do fragmento obtido de cada bactéria ácido láctica isolada foi comparado com o perfil do fragmento da cultura de referência.

### 3 Resultados e Discussão

A identificação das espécies de *Lactobacillus* que dominam a microbiota de salames fermentados é uma importante etapa no desenvolvimento de novos cultivos iniciadores para a fermentação cárnea (ANDRIGUETTO, ZAMPESE & LOMBARDI, 2001). No presente estudo, entre as 168 culturas de bactérias ácido lácticas isoladas, 127 culturas (75,6%) foram caracterizadas como bactérias ácido lácticas homofermentativas, Gram-positivas e catalase-negativas. Os *Lactobacillus* homofermentativos são desejáveis como cultivos iniciadores porque produzem somente ácido láctico de açúcares disponíveis, enquanto que os *Lactobacillus* heterofermentativos produzem, além do ácido láctico, o ácido acético, etanol e dióxido de carbono (GEISEN, LÜCKE & KRÖCKEL, 1992). A alta concentração de ácido acético resulta em um pungente *off-flavor* e a alta quantidade de dióxido de carbono produz indesejáveis cavidades ou “buracos” no produto (BUCKENHÜSKES, 1993).

Todas as culturas isoladas foram hábeis para se desenvolver em pH 3,9 e 9,6 a 37°C. Quatro das culturas isoladas (AL2, AP3, AD3 e AM2) foram hábeis para se desenvolver em agar MRS suplementado com 7% de NaCl e uma cultura (C5) foi hábil para se desenvolver em agar MRS, suplementado com 10% de NaCl. Todas as culturas isoladas foram hábeis para se desenvolver em agar MRS a 8°C, mas somente três das culturas (C5, AN3 e AM2) foram hábeis para se desenvolver a 45°C (Tabela 1).

Tabela 1: Características bioquímicas e fisiológicas de bactérias ácido lácticas isoladas e de culturas de referência

Culturas	<i>L. Plantarum</i> ATCC 8014	AJ2	AL2	AB4	R2	AP3	C5	AF5	AD3	AN3	AM2	<i>L. pentosus</i> ATCC 8041
CO <sub>2</sub> de glicose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desenvolvimento: em 7% NaCl	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-



Trehalose	+	+	+	?	+	-	+	+	+	+	+	+
Insuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	?
D - Raffinose	+	+	+	?	+	?	?	-	+	?	+	-
Amidon	-	-	-	?	-	-	-	-	?	-	-	-
Glycogene	-	-	-	-	-	-	?	-	?	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ - Gentibiose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
D - Turanose	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
D - Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D - Tagalose	-	+	-	?	+	+	?	+	+	?	+	+
D - Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L - Fucose	-	?	-	-	-	-	-	?	-	-	?	-
D - Arabitol	-	?	?	-	-	-	-	-	-	-	?	-
L - Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	-	-	+	-	-	-	-	-	?	-	-	?
2 ceto -gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 ceto - gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Teste positivo (+) com transformação da cor violeta para amarela (para hidrólise de esculina transformação da cor verde para preto); negativo (-), sem transformação da cor violeta; e duvidoso (?), para outra cor observada.

Na fermentação cárnea, a atividade fisiológica dos microrganismos provoca transformações desejáveis, as quais decisivamente determinam as características do produto. A habilidade das culturas para se desenvolver em pH 3,9 é um fator significativo, porque a mais importante transformação provocada pelas bactérias ácido lácticas na maturação dos produtos cárneos é o decréscimo do pH em função da produção do ácido láctico (GEISEN, LÜCKE & KRÖCKEL, 1992). O decréscimo do pH em salames causa vários efeitos e interações. Os mais importantes são a coagulação das proteínas cárneas, todas as reações necessárias para a formação e estabilidade da cor e o decréscimo da capacidade de retenção da água ligada às proteínas (BUCKENHÜSKES, 1993). Em consequência, a acidificação diminui o período de maturação do produto (JESSEN, 1995).

A tolerância ao sal (NaCl) é um outro fator significativo para a escolha de uma cultura como cultivo iniciador em produtos cárneos fermentados (ROVIRA et al., 1997). Uma cultura hábil para desenvolver-se em 6,5% de NaCl poderia resultar na seleção de uma cultura resistente para altas concentrações de sal durante o processamento do salame. Culturas sensíveis ao NaCl, presentes no início do processo, poderiam parar de se desenvolver quando a concentração do sal fosse maior, na maturação do produto (AMMOR et al., 2005a).

Os resultados da caracterização fenotípica das 10 culturas isoladas estão apresentados na Tabela 1. A interpretação do perfil de fermentação (Tabela 2) foi facilitada pelo uso da base de dados “API-WEB” (BioMérieux), na qual a identificação de um microrganismo é acompanhada pela seguinte informação: a percentagem de identificação (% id), como uma estimativa do perfil da cultura correspondente ao relativo perfil e classe taxionômica de culturas inscritas na base de dados. Os resultados sugerem a cultura *L. plantarum* ATCC 8014 e as culturas AJ2, AD3, AN3 e AM2, como *L. plantarum* com % id  $\geq 96,7$ ; a cultura AL2 como *L. plantarum* com % id = 72 e como *L. pentosus* com % id = 27,3; as culturas AF5, C5 e AP3 como *Pediococcus pentosaceus* com % id  $\geq 96,5$ ; a cultura R2, como *L. pentosus* com % id = 89,4 e como *L. plantarum* com % id = 10,4. A cultura AB4 apresentou caracterização fenotípica duvidosa: *L. pentosus* ou *Lactococcus lactis* ssp *lactis*. A cultura *L. pentosus* ATCC 8041 apresentou % id = 90,2 como *L. pentosus*.

Usando os iniciadores 16/Lpl, os fragmentos de DNA da cultura *L. plantarum* ATCC 8014 e das sete culturas isoladas (AJ2, AL2, R2, AF5, AD3, AN3 e AM2) resultaram em produtos de PCR de aproximadamente 220bp (Figura 1). Conforme Berthier & Ehrlich (1998) e os resultados da PCR, a caracterização molecular das referidas culturas sugerem a espécie *L. plantarum*. Quanto às culturas lácticas AB4, AP3 e C5, não foram observadas ampliações de fragmentos de DNA das respectivas culturas utilizando os iniciadores 16/Lpl e também os iniciadores Lbp11/Lbp12 (Figuras 1 e 2). Considerado os resultados da caracterização fenotípica e da caracterização molecular, entende-se que as culturas AB4, AP3 e C5 não se caracterizam como culturas *L. plantarum*. Fragmentos de DNA da cultura de *L. pentosus* ATCC 8041 também não resultaram em produtos de PCR utilizando os iniciadores 16/Lpl (dados não

apresentados), corroborando com os resultados de Berthier & Ehrlich (1998). Usando os iniciadores LbP11/LbP12, conforme Quere, Deschamps & Urdaci (1997), a caracterização molecular das culturas *L. plantarum* ATCC 8014, AJ2, AL2, R2, AF5, AD3, AN3 e AM2 também foram caracterizadas como espécie *L. plantarum* (Figura 2). Usando os iniciadores 16/Lpe, específicos para *L. pentosus*, a amplificação do DNA bacteriano foi observado para *L. pentosus* ATCC 8041; porém, para as demais culturas, não foram observados resultados de amplificações (dados não apresentados).

Conforme Berthier & Ehrlich (1998), os iniciadores 16/Lpl e 16/Lpe permitem distinguir as espécies *L. plantarum* de *L. pentosus*, as quais apresentam características semelhantes. Os referidos iniciadores são complementares para uma variedade de seqüências na região 16S/23S do DNA de *L. plantarum* e *L. pentosus*.

Tabela 2: Caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas e de culturas de referência

Culturas	Origem	API 50 CH		
		Porcentagem identificação	Caracterização fenotípica	Caracterização molecular
<i>L. plantarum</i> 8014	ATCC	99,5	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
AJ2	Salame/ cultura natural	96,7	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
AL2	Salame/ cultura natural	72 27,3	<i>L. plantarum</i> <i>L. pentosus</i>	<i>L. plantarum</i>
AB4	Salame/ cultura natural	-	<i>Pediococcus</i> <i>pentosaceus</i> <i>L. lactis ssp lactis</i>	Não caracterizada
R2	Salame/ cultura natural	89,4 10,4	<i>L. pentosus</i> <i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
AP3	Salame/ cultura natural	97,7	<i>P. pentosaceus</i>	Não caracterizada
C5	Salame/ cultura natural	98,7	<i>P. pentosaceus</i>	Não caracterizada
AF5	Salame/ cultura natural	96,5	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. plantarum</i>

AD3	Salame/ cultura natural	98,7	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
AN3	Salame/ cultura natural	98,7	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
AM2	Salame/ cultura natural	96,7	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. pentosus</i> 8041	ATCC	90,2	<i>L. pentosus</i>	<i>L. pentosus</i>

Uma clara identificação de espécies, especialmente entre as espécies *Lactobacillus*, algumas vezes pode ser difícil, usando somente métodos fenotípicos como o perfil de fermentação de açúcares, devido a um crescente número de espécies de bactérias ácido lácticas, que variam em um número muito pequeno de características bioquímicas (QUERE, DESCHAMPS & URDACI, 1997). Reenen e Dicks (1996) concluem que reações similares de fermentação de açúcares não são suficientes para a classificação fenotípica de *L. plantarum* e *L. pentosus*, porque existem significativas similaridades entre os perfis de reação das duas espécies. Embora a técnica fenotípica, como o sistema API 50CH, seja utilizada como ferramenta importante para discriminar espécies de *Lactobacillus*, o uso de métodos genéticos tem sido a orientação para a taxionomia de *Lactobacillus* e uma identificação segura (VANDAMME et al., 1996).

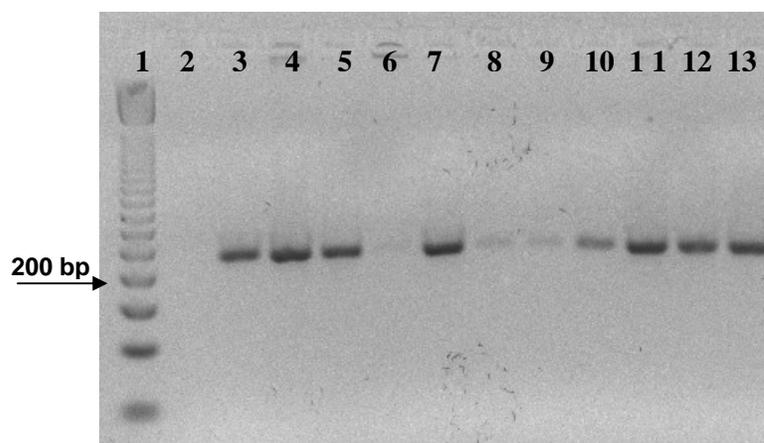


Figura 1: Produtos da PCR obtidos de bactérias ácido lácticas isoladas usando primers 16/Lpl (2,5% gel de agarose). Linha1: 50 bp ladder (Promega); linha 2: água; linha 3: *L. plantarum* ATCC 8014; linha 4: AJ2; linha 5: AL2; linha 6: AB4; linha 7: R2; linha 8: AP3; linha 9: C5; linha 10: AF5; linha 11: AD3; linha 12: AN3 e linha 13: AM2.

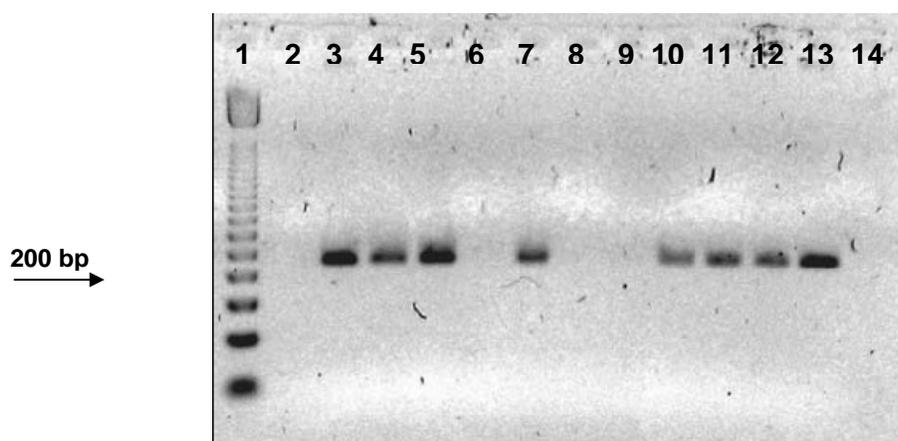


Figura 2: Produtos da PCR obtidos de bactérias ácido lácticas isoladas usando primers Lbp11/Lbp12 (2,5% gel de agarose). Linha1: 50 bp ladder (Promega); linha 2: água; linha 3: *L. plantarum* ATCC 8014; linha 4: AJ2; linha 5: AL2; linha 6: AB4; linha 7: R2; linha 8: AP3; linha 9: C5; linha 10: AF5; linha 11: AD3; linha 12: AN3; linha 13: AM2; linha 14: *L. pentosus* ATCC 8041.

A caracterização fenotípica corroborou a caracterização molecular - PCR espécie-específica para as culturas de referência *L. pentosus* ATCC 8041 e *L. plantarum* ATCC 8014 e, também, para as culturas isoladas AJ2, AL2, AD3, AN3 e AM2, mas não para as culturas AF5 e R2 (Tabela 2).

#### 4 Conclusão

Entre as bactérias ácido lácticas isoladas de salames artesanais naturalmente fermentados, caracterizadas como *L. plantarum*, as culturas AL2, AD3 e AM2 são as mais promissoras, pois são tolerantes ao sal. O seqüenciamento 16S rDNA poderá ser aplicado para confirmar a identificação das culturas AJ2, AL2, AD3, AN3 e AM2.

#### Agradecimento

Este trabalho teve o apoio da EMBRAPA, UNIJUÍ, UFSC e bolsa de iniciação científica - CNPq.

## Referências

1. AMMOR, S. et al. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, v. 22, p. 373 - 382, 2005a.
2. AMMOR, S. et al. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausages for their potential use as starter culture *Food Microbiology*, v. 22, p. 529 - 538, 2005b.
3. AYMERICH, T. et al. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied Environment Microbiology*, v. 69, p. 4583 - 4594, 2003.
4. ANDRIGUETTO, C.; ZAMPESE, L.; LOMBARDI, A. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meats plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, p. 26 – 30, 2001.
5. BERTHIER, F.; EHRLICH, S.D. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR *primers* that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters*, v. 161, p. 97 – 106, 1998.
6. BROMBERG, R. et al. Oliveira, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 35, p. 137 - 144, 2004.
7. BUCKENHÜSKES, H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 12, p. 253 – 272, 1993.
8. DEJENANE, D. et al. Effect of lactic acid bacteria on extension of shelf life and growth of *Listeria monocytogenes* in beef steaks stored in CO<sub>2</sub>-rich atmosphere. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 405 - 412, 2005.
9. DROSINOS, E.H. et al. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, v. 24, p. 260 - 270, 2007.
10. FIORENTINI, A.M. et al. Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 42 - 46, 2001.

11. GEISEN, R.; LÜCKE, F.K.; KRÖCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch*, v. 72, p. 894 - 898, 1992.
12. HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of food Microbiology*, v. 75, p. 197 – 212, 2002.
13. JESSEN, B. Starter cultures for meat fermentation. In: Campbell – Platt; Cook, P. E. *Fermented meats*. London: Blackie Academe Professional, p. 130 – 159, 1995.
14. LEROY, F., VUYST, L. D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, p. 67-78, 2004.
15. LÜCKE, F.-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, v. 56, p. 105 – 115, 2000.
16. LÜCKE, F.-K. Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken. *Band 5 der Kulmbacher Reihe, S*, p. 85 – 102, 1985.
17. MACIEL, J.F. et al. Antibacterial activity of lactic cultures isolated of Italian salami. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34 (suppl.1), p. 121 - 122, 2003.
18. PARENTE, E.; GRIEGO, S.; CRUDELE, M.A. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *Journal Applied Microbiology*, v. 90, p. 943 - 952, 2001.
19. QUERE, F.; DESCHAMPS, A. URDACI, M.C. DNA probe and PCR –specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *Journal Applied Microbiology*, v. 82, p. 783 – 790, 1997.
20. RANTSIOU, K. et al. Comi, G.; Cocolin, L. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*, v. 22, p. 19 - 28, 2005.
21. REENEN, C.A.V.; DICKS, L.M.T. Evaluation of numerical analysis of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus*. *Current Microbiology*, v. 32, p. 183 - 187, 1996.
22. ROVIRA, A. et al. Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages. *Microbiologia*, v. 13, p. 201 - 208, 1997.

23. SAMELIS, J. et al. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiology*, v. 11, p. 447 – 460, 1994.
24. SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.K. Identification of lactobacilli from meat products. *Food Microbiology*, v. 4, p. 199 – 208, 1987.
25. VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology Reviews*, v. 60, p. 407- 438, 1996.
26. VOGEL, R.F. et al. Molecular characterization of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake* isolated from sauerkraut and their application in sausage fermentations. *Journal Applied Bacteriology*, v. 74, p. 295 – 300, 1993.

***Lactobacillus plantarum* isolados de salames artesanais naturalmente fermentados e estudos de suas propriedades tecnológicas para aplicação como cultivos iniciadores**

Maristela Cortez Sawitzki<sup>4\*</sup>; Ângela Maria Fiorentini<sup>1,5</sup>; Teresinha Marisa Bertol<sup>6</sup>;  
Ernani S. Sant'Anna<sup>1</sup>

Submetido à Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA (set/2007)

### **Resumo**

No presente estudo foi investigado as propriedades tecnológicas de culturas de *L. plantarum*, isoladas de salames artesanais, naturalmente fermentados, manufaturados na região Sul do Brasil, a fim de obter um cultivo iniciador. As propriedades tecnológicas investigadas foram as seguintes: habilidade das culturas para crescer em diferentes valores de pH, em diferentes concentrações de sal e na presença de sal de cura comercial; rápida produção de ácido, produção do isômero D - ou L - ácido láctico, atividade nitrato redutase, atividade antagonística e estabilidade das culturas após processo de fermentação, concentração e liofilização. Todas as culturas apresentaram eficiência quanto às propriedades tecnológicas investigadas.

Palavras-chave: *L. plantarum*; propriedades tecnológicas; salame

### **Abstract**

In the present study, technological properties of *L. plantarum* strains isolated from naturally fermented sausages manufactured in the South region of Brazil were investigated in order to obtain a starter culture. Technological properties evaluated were the following: ability to growth at different pH values, at different temperatures, in different salt concentrations and in the presence of commercial cure salt; fast production of acid; determination of D - and L - lactic acid; activity nitrate reductase; antagonistic activity and stability of the isolated cultures over the fermentation, concentration and freeze-drying process. The isolated strains showed effectiveness to improve technological properties as starter culture.

**Keywords:** *L. plantarum*; technological properties; sausage

---

<sup>4\*</sup> Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, CEP: 880034-001 - Florianópolis, SC – Brasil.

<sup>5</sup> Depto. de Biologia e Química – UNIJUÍ - RS 344, km 39, CEP: 98900-000 - Santa Rosa, RS – Brasil.

<sup>6</sup> EMBRAPA SUÍNOS e AVES, BR 153 km 110 Vila Tamanduá, CEP: 89700-000 – Concórdia, SC - Brasil

\* A quem a correspondência deverá ser enviada

## 1 Introdução

A manufatura de alimentos fermentados tem uma longa tradição. Nos primeiros tempos, o processo era empírico, sem o conhecimento específico da relação entre a atividade metabólica dos microrganismos (chamada *house flora*) e as transformações desejáveis realizadas nos alimentos (GEISEN, LÜCKE & KRÖCKEL, 1992). Ao longo do tempo, a fermentação possibilitou aumentar a vida de prateleira e a segurança dos alimentos, disponibilizando alimento para as pessoas sobreviverem em períodos de inverno e seca (HOLZAPFEL, 1997). A fermentação espontânea de salames é caracterizada pela participação de bactérias ácido lácticas; por cocos Gram-positivo, catalase-positivo; por leveduras e por bolores (BUCKENHÜSKES, 1993).

Modernos cultivos iniciadores são microrganismos selecionados a partir de uma única espécie ou múltiplas espécies, especificamente adaptadas para o substrato ou matéria-prima (HOLZAPFEL, 2002). A inoculação da massa de salame com cultivos iniciadores compostos de bactérias ácido lácticas selecionadas, por exemplo, lactobacilos homofermentativos e/ou pediococos e cocos Gram-positivo, catalase-positivo (*Staphylococcus e Kokuriae*), promove a segurança, a qualidade e a padronização do produto, além de consistente *flavor*, cor característica e menor tempo de maturação (LEROY, VERLUYTEN & VUYST, 2006; RANTSIOU et al., 2005). No referido consórcio microbiano, as bactérias ácido lácticas têm importante função. Elas afetam ambas as propriedades tecnológicas e a estabilidade microbiana do produto final devido à produção dos ácidos láctico e acético e o conseqüente decréscimo de pH do produto (DROSINOS et al, 2007).

A fermentação cárnea pela microbiota natural pode algumas vezes falhar, causando prejuízos à qualidade do produto e por essa razão a adição de cultivos iniciadores em salames tem sido recomendada (ANDRIGUETTO, ZAMPESE & LOMBARDI, 2001; HOLZAPFEL, 2002; RANTSIOU et al., 2005). É importante o uso de cultivos iniciadores constituídos de lactobacilos isolados de produtos locais, porque esses microrganismos estão bem adaptados para o produto e para a tecnologia específica de produção (ANDRIGUETTO, ZAMPESE & LOMBARDI, 2001). Cultivos iniciadores contendo bactérias ácido lácticas de origem da

microbiota da carne são hábeis para adaptar-se à ecologia da fermentação cárnea (HUGAS et al., 1993). Outra questão significativa é a de que a eficiência de cultivos iniciadores cárneos comerciais, quando aplicados em um tipo de salame, não necessariamente deverá ser a mesma para outro tipo de salame, em outro local, sob diferentes condições de produção (LEROY, VERLUYTEN & VUYST, 2006).

O objetivo do presente trabalho foi investigar as propriedades tecnológicas de culturas de *Lactobacillus plantarum* isolados de salames artesanais, fermentados naturalmente, sem a adição de cultivos iniciadores, manufaturados na região Sul do Brasil, visando obter um cultivo iniciador para produtos cárneos fermentados.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Culturas bacterianas e condições de desenvolvimento

As sete culturas de *L. plantarum* utilizadas neste estudo (codificadas como AJ2, AL2, R2, AF5, AD3, N3 e AM2) foram selecionadas a partir de estudos prévios de caracterização morfológica, fenotípica e molecular de dez culturas de bactérias ácido lácticas, isoladas e caracterizadas por Sawitzki et al. (2007).

Todas as culturas foram desenvolvidas em agar MRS (De Man, Rogosa e Sharp; Merck, Darmstadt, Germany) e incubadas anaerobicamente a 37°C por 48h. Após incubação, *swab* de cada cultura bacteriana desenvolvida sobre o agar MRS foi novamente inoculada em 10 mL de caldo MRS (Merck, Darmstadt, Germany) e incubado a 37°C por 24h. Ao caldo com a cultura desenvolvida foi adicionado glicerol (20%), como crioprotetor, congelado e estocado a - 80°C.

Para os testes de atividade antagonística, culturas de referência foram adquiridas da coleção Fundação André Tosello: *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971, *Listeria monocytogenes* NCTC 098630, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12598. Uma cultura de *Staphylococcus xylosus* isolada de salame artesanal, manufaturado sem a adição de cultivos iniciadores, na região Sul do Brasil, também foi utilizada no teste de atividade antagonística.

## 2.2 Propriedades tecnológicas

As propriedades tecnológicas como cultivo iniciador, de cada cultura de *L. plantarum* isolada, foram investigadas conforme Buckenhüskes (1993); Holzapfel (2002); Lee, Kim, & Kunz (2006); Saarela et al. (2006) e as características de salames fermentados manufaturados na região Sul do Brasil.

Para os testes de atividade antagonística, foram selecionadas culturas que apresentam risco de doenças ou toxidade em salames fermentados, conforme Leroy, Verluyten & Vuyst (2006). A espécie *Staphylococcus xylosus*, também foi testada, porque é um dos mais importantes microrganismos utilizados como cultivo iniciador em produtos cárneos (GEISEN, LÜCKE & KRÖCKEL, 1992).

Todos os testes foram realizados em duplicata.

### 2.2.1 Habilidade das culturas para crescer em pH 3,9, rápida produção de ácido e determinação da produção de D – ou L – ácido láctico

Crescimento em pH 3,9 foi observado após 3 dias de incubação a 37°C em agar MRS (Merck, Darmstadt, Germany) ajustado o pH com HCl<sub>(1M)</sub> para 3,9. Uma alçada (0,2 cm de diâmetro) de cada cultura de *L. plantarum* desenvolvida sobre o agar MRS foi inoculada em 45 mL de caldo MRS (Merck, Darmstadt, Germany) e após 12 h de incubação a 37°C; o inóculo foi adicionado em 4,5 L de caldo MRS. A produção de ácido foi identificada através do monitoramento da medida do pH do meio de cultura (caldo MRS) durante 12 h de fermentação em um fermentador (New Brunswick scientific, model Bioflo 2000; New Brunswick, USA). Desse caldo, foram retiradas alíquotas para determinação dos isômeros D – ou L – ácido láctico. Os percentuais dos isômeros D – ou L – ácido láctico produzidos pelas culturas, individualmente, em caldo MRS, foram determinados através do kit enzimático D - / L – ácido láctico (R – Biopharm AG, Darmstadt, Germany), conforme orientações do fabricante e o respectivo protocolo: Determinação de ácido láctico em amostras de fermentação ou meios de culturas de células.

### 2.2.2 Crescimento em altas concentrações de sal e na presença de sal de cura comercial

Crescimento de cada cultura em altas concentrações de sal foi observado após 3 dias de incubação das mesmas a 37°C em agar MRS (Merck, Darmstadt, Germany) adicionado com 6,0% e 7,0% de NaCl (Merck, Darmstadt, Germany), respectivamente. Crescimento na presença de sal de cura comercial foi observado após 3 dias de incubação a 37°C em agar MRS (Merck, Darmstadt, Germany) adicionado de sal de cura comercial (Cura 102 – Duas Rodas Industrial Ltda, Jaraguá do Sul, Brasil), com nitrato de sódio na concentração de 300 mg . kg<sup>-1</sup> e nitrito de sódio na concentração de 150 mg . kg<sup>-1</sup> de massa cárnea.

### 2.2.3 Atividade nitrato redutase

Para o teste da atividade nitrato redutase, para cada cultura de *L. plantarum* desenvolvida em agar MRS (Merck, Darmstadt, Germany) (incubado em anaerobiose a 37°C por 48h), foi realizado um *swab* e o mesmo suspenso em água peptonada estéril (0,1%), atingindo turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarlan. Uma alíquota de 1,0 mL da suspensão bacteriana homogeneizada foi adicionada em cada tubo estéril contendo caldo nitrato (DIFCO, Lawrence, USA). Todos os tubos foram incubados a 37°C por 48h. Após o período de incubação, foi adicionada, em cada tubo, uma gota de cada reagente do NIT test (NIT 1 + NIT 2 reagents – bioMérieux®as, Marcy l'Etoile, France). Após 10 minutos, uma coloração vermelha foi indicativa de reação positiva para a redução de nitrato a nitrito. Um tubo, controle positivo, foi utilizado com a inoculação da cultura *Staphylococcus xylosus* ATCC 29971, nitrato redutase positivo.

### 2.2.4 Atividade antagonística

A atividade antagonística das culturas *L. plantarum* foi observada através do método *spot on the law*, conforme Lewus, Kaiser & Montville (1991) e Okereke &

Montville (1991). 2,0 µL de cada cultura de *L. plantarum*, reativada em caldo MRS a 37°C por 24h, foram adicionados em respectivos orifícios de 2,0 mm de diâmetro em agar TSAYE (Tryptic Soy Agar - TSA; Merck, Darmstadt, Germany) adicionado de 0,5% de extrato de levedura (Yeast Extract – YE; Merck, Darmstadt, Germany). Após incubação (sob anaerobiose, a 37°C por 48h), em cada placa contendo o TSAYE com a respectiva cultura de *L. plantarum*, foi adicionada uma sobrecamada, com aproximadamente 8,0 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion, Merck, Darmstadt, Germany), adicionado de 1,0% de agar e, respectivamente, inoculado com as culturas teste *Listeria monocytogenes* NTC 098630, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Staphylococcus xylosum* ATCC 29971 e a cultura *Staphylococcus xylosum* isolada, em concentração aproximada de  $10^5 - 10^6$  UFC . mL<sup>-1</sup> de cada cultura. As placas com a sobrecamada (uma placa-controle não inoculada com cultura teste) foram incubadas sob anaerobiose a 30°C por 48h e observado quanto à zona de inibição. A atividade antagonística foi considerada positiva, se foi observado uma zona clara de inibição (largura ≥ 3,0 mm) ao redor de cada cultura de *L. plantarum*, conforme Sarkar & Banerjee (1996).

#### 2.2.5 Estabilidade das culturas isoladas após processo de fermentação, concentração e liofilização

Células da cultura isolada (45 mL do inóculo na concentração de  $10^9$  UFC . mL<sup>-1</sup>) foram adicionadas e desenvolvidas em 4,5 L de caldo MRS, usando um fermentador (New Brunswick scientific, model Bioflo 2000; New Brunswick, USA) sob as seguintes condições de fermentação: temperatura a 37°C, agitação de 80 rpm e aeração de 0,7 vvm (litros de ar atmosférico filtrado . litros do meio de cultura<sup>-1</sup> . min<sup>-1</sup>) por 12 h. A média dos valores da população bacteriana foi determinada durante a fermentação, mediante a contagem de colônias em placas e respectiva densidade ótica (DO) do meio a 630 nm. Após 12h de fermentação (DO 2,408 e respectiva população bacteriana de aproximadamente  $10^9$  UFC . mL<sup>-1</sup> – fase logaritmo de crescimento), as células foram concentradas por centrifugação a 4.000 x g, durante 30 min a 4°C (Centrífuga modelo NT825; Nova Técnica, Piracicaba, Brasil). Em seguida, as células foram suspensas em leite em

pó reconstituído 10% ( $m \cdot v^{-1}$ ) como crioprotetor, para 1/50 do volume do caldo original e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A liofilização foi realizada em um liofilizador modelo LT 1000/8 (Terroni Equipamentos Científicos Ltda., São Carlos, Brasil,) durante 24h. As culturas liofilizadas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após o período de 4 semanas e de 6 meses de estocagem, respectivamente, a cultura liofilizada foi suspensa em água peptonada estéril 0,1% ( $2,5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e subseqüentes diluições), inoculada em agar MRS (sob anaerobiose a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48h) e determinado a população bacteriana através da contagem de colônias em placa, a fim de avaliar a estabilidade da cultura.

### 3. Resultados e discussão

Todas as culturas de *L. plantarum* isoladas foram hábeis para crescer em agar MRS com respectivo valor de pH a 3,9. Durante a fermentação em caldo MRS, as referidas culturas também foram hábeis para a produção de ácido, porque, em média, os valores de pH decresceram do valor inicial de 6,47 para 4,43 em 16h de fermentação (Figura 1), permanecendo este valor médio de pH até o período final de 24h de fermentação.

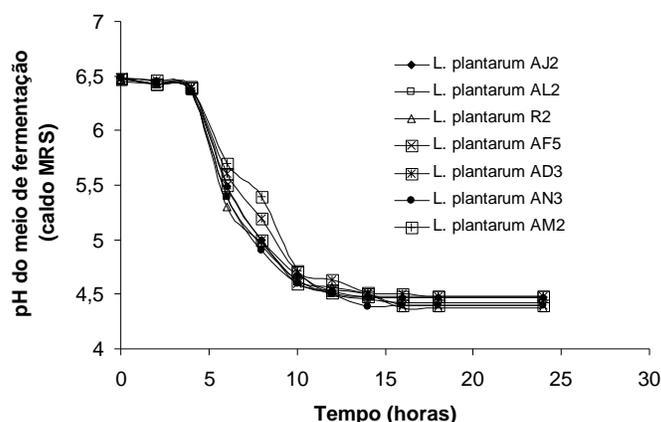


Figura 1: Valores médios de pH do meio de cultura MRS, inoculado com culturas de *L. plantarum*, durante 24h de fermentação.

A mais importante transformação provocada pelas bactérias ácido lácticas homofermentativas na maturação dos produtos cárneos é a redução do pH em

conseqüência da secreção do ácido láctico (GEISEN , LÜCKE & KRÖCKEL, 1992). A propriedade das culturas se desenvolverem em pH 3,9 é significativa, porque o decréscimo do pH em produtos cárneos fermentados (para valores iguais ou menores que 5,0) promove importantes reações químicas no salame: coagulação das proteínas cárneas; todas as reações necessárias para a formação e a estabilização da cor e a melhoria da estabilidade do produto (BUCKENHÜSKES, 1993). A acidificação reduz o teor de água ligada e, conseqüentemente seca o produto, diminuindo o tempo de maturação do mesmo (JESSEN, 1995).

A propriedade das bactérias ácido lácticas, em particular os lactobacilos, para produzir ácido e diminuir o pH, previne o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, melhorando a higiene, a segurança e a estocagem do produto cárneo (LÜCKE, 1985; SAMELIS et al., 1994). Um rápido decréscimo do pH para o valor próximo de 5,3 é importante para a inibição de salmonela e *Staphylococcus aureus* se os produtos são fermentados em temperatura próxima de 18°C (SCHILLINGER & LÜCKE, 1989). *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* foram suscetíveis à inibição por nitrito somente em valores de pH menores que 7.0 (GRAY & PEARSON, 1984). A acidificação da carne picada durante a produção do salame pode ser alcançada pela adição do acidificante glucona-delta-lactona ou por fermentação. Em ambos os casos, serão alcançadas a segurança, maior período de vida de prateleira e melhoria da fatiabilidade do salame, mas o original *flavor* e aroma do produto somente poderão ser obtidos pela fermentação (BUCKENHÜSKES, 1993).

O ácido láctico produzido pelas bactérias ácido lácticas pode ocorrer nas formas isoméricas: L – ácido láctico e D – ácido láctico (SHU, HÅKANSON, MATTIASSON, 1995). O isômero produzido durante a fermentação é tipicamente relatado para a espécie de Lactobacillus, a qual o produz, por exemplo, D (-) ácido láctico para *L. delbrueckii* (todas as subespécies), L (+) para *L. casei* e uma forma racêmica (DL) para *L. sakei* e todos os lactobacilos heterofermentativos (HOLZAPFEL, 2002). *L. plantarum* produz um racêmico DL – lactato (KLANDER & WEISS, 1986). Muitos lactobacilos produzem a forma racêmica DL – lactato, mas a razão entre D – lactato e L – lactato é variável (GOFFIN et al., 2005).

No presente estudo, todas as culturas *L. plantarum* isoladas produziram a forma racêmica DL - ácido láctico, em média 67,23% do L - ácido láctico e 32,76% do D - ácido láctico ( $\text{m} \cdot \text{v}^{-1}$ ) como produto final da fermentação de açúcar (Tabela 1). Os isômeros do ácido láctico apresentam diferenças quanto ao mecanismo antibacteriano, por exemplo, *Listéria monocytogenes* foi mais sensível para o D-ácido láctico que para o L-ácido láctico, em estudo realizado por Gravesen *et al.* (2004). Neste caso, a produção de D-ácido láctico pelas culturas de *L. plantarum* isoladas, é um importante fator, mas é necessário investigar a concentração deste isômero em alimentos e bebidas fermentados porque níveis elevados do D - ácido láctico não são hidrolizados pelas enzimas lactato desidrogenase em seres humanos, principalmente em crianças, sendo capaz de causar acidose (HOLZAPFEL, 2002; LIU, 2003; ZHANG *et al.*, 2003).

Tabela 1: Determinação dos percentuais dos isômeros D e L - ácido láctico em caldo MRS (2,0% de glicose), produzido por culturas de *L. plantarum*, após 12h de fermentação e valor médio de pH em torno de 4,47.

<i>L. plantarum</i>	D – ácido láctico			L – ácido láctico		
	percentagem	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{mMol} \cdot \text{L}^{-1}$	percentagem	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{mMol} \cdot \text{L}^{-1}$
ATCC 8014	1,16	0,010	0,11	98,84	0,841	9,24
AL2	34,70	0,209	2,32	65,28	0,393	4,32
AJ2	33,53	0,058	0,64	66,47	0,115	1,26
AM2	34,66	0,078	0,86	65,33	0,147	1,61
AD3	31,30	0,072	0,79	68,69	0,158	1,74
AN3	29,67	0,067	0,74	70,73	0,159	1,75
AF5	34,32	0,069	0,76	65,68	0,132	1,45
R2	31,13	0,066	0,73	68,86	0,146	1,60

A tolerância ao NaCl é outra propriedade significativa para a escolha de uma cultura como cultivo iniciador em produtos cárneos fermentados (ROVIRA *et al.*, 1997). Culturas hábeis para crescer em meio com 6,5% de NaCl poderiam resultar na seleção de uma cultura resistente a altas concentrações de sal durante o processamento do salame, porque culturas sensíveis ao NaCl, presentes no início do processo, parariam de crescer quando a concentração do NaCl ficasse muito alta, em função da maturação e conseqüente perda de líquidos pelo produto

(AMMOR et al., 2005a). Conforme Olesen, Meyer & Stahnke (2004), a concentração inicial (aproximadamente 3%) é a quantidade normal utilizada em salames. Entretanto, a concentração final de NaCl, após maturação do salame, pode ficar entre 4,2 e 6,0% devido à perda de umidade pelo produto (MORETTI et al., 2004; PAPADIMA et al., 1999 e ZANARDI et al., 2004)

Conforme Papamanoli et al. (2003) de sete culturas de *L. plantarum* isoladas de salames fermentados naturalmente, todas foram hábeis para crescer em 6,5%, 8,0% e 10% de NaCl (m . m<sup>-1</sup>). No presente estudo, entre as sete culturas isoladas, três (*L. plantarum* AL2, *L. plantarum* AD3 e *L. plantarum* AM2) foram hábeis para se desenvolverem em agar MRS suplementado com 6,0% e 7,0% de NaCl.

Assim como o ácido láctico e o NaCl, o sal de cura também é um importante elemento para a composição das características sensoriais, microbiológicas e físico-químicas do produto cárneo. No presente estudo, todas as culturas isoladas foram hábeis para crescer em agar MRS suplementado com sal de cura comercial, na respectiva concentração para salames (300 mg.kg<sup>-1</sup> de nitrato de sódio e 150 mg.kg<sup>-1</sup> de nitrito de sódio).

Segundo Deibel (1974), citado por Smith & Palumbo (1983), sal e nitrito-tolerante (crescimento vigoroso em 6% de NaCl e em 100 ppm de nitrito) são desejáveis características para escolha de cultivos iniciadores em produtos cárneos. A tolerância ao sal de cura é outro significativo critério para a escolha de culturas como cultivos iniciadores em produtos cárneos fermentados, porque o uso de agentes de cura (nitratos e nitritos de sódio ou potássio) é um importante recurso para a conservação do produto. O nitrito como agente de cura é um preservativo e o único agente com ação contra bactérias formadoras de toxinas, como o *Clostridium botulinum* (CAMMACK et al., 1999). Conforme Gray & Pearson (1984), citando Kramlich, Pearson & Tauber (1973), nitrito tem várias importantes funções em produtos cárneos: (1) estabiliza a cor, (2) contribui para as características do *flavor* de carne curada, (3) inibe o crescimento de microrganismos deteriorantes e toxigênicos, especialmente o *Clostridium botulinum* e (4) retarda o desenvolvimento da rancidez. O uso de nitratos é interessante porque melhora a formação do *flavor* comparado ao nitrito (WIRTH, 1991). Segundo Gray & Pearson (1984), o American Meat Institute (1945)

declarou que o nitrato é transformado em nitrito por microrganismos e que os mesmos têm importante efeito no sabor característico dos produtos curados. Para Marco, Navarro & Flores (2006), a adição de nitratos e/ou nitritos na manufatura de salames fermentados secos dificilmente afeta as características sensoriais do produto; entretanto, nitritos e nitratos afetam, ambos, os processos oxidativos e a geração de compostos voláteis originários do metabolismo de microrganismos.

Em um longo processo de cura de produtos cárneos, nitrato é uma fonte de nitrito (TOLDRÁ, 2005, citado por Marco, Navarro & Flores, 2006) reação em que o nitrato é reduzido a nitrito pela ação da enzima nitrato redutase, a qual geralmente tem origem de microrganismos do grupo *Micrococaceae* (BUCKENHÜSKES, 1993). Algumas culturas de lactobacilos podem reduzir nitrato para nitrito e nitrito para monóxido de nitrogênio sob condições anaeróbias (WOLF & HAMMES, 1988). Quatro culturas de *L. fermentum* testadas por Xu & Verstraete (2001) apresentaram atividade nitrato redutase sob condições de anaerobiose, mas as duas culturas de *L. plantarum* testadas não apresentaram a respectiva atividade. Algumas culturas de *L. plantarum* são hábeis para reduzir nitrato sob condição limitada de glicose no meio e pH com valor igual ou maior que 6,0 (KLANDER & WEISS, 1986). No presente estudo, nenhuma cultura de *L. plantarum* isolada apresentou atividade nitrato redutase. Conforme Buckenhüskes (1993), a cura de produtos cárneos na ausência de cocos é somente concebível quando bactérias ácido lácticas apresentam alta atividade nitrato redutase. Portanto, se o processo de fermentação cárnea exigir atividade nitrato redutase, sugere-se a utilização das referidas culturas de *L. plantarum* isoladas, associadas com culturas *Micrococaceae* nitrato redutoras ou outras culturas com atividade nitrato redutase.

Após quatro semanas e seis meses de estocagem a -20 °C, respectivamente, a população microbiana de cada cultura de *L. plantarum* isolada, permaneceu em aproximadamente 9 Log UFC . mL<sup>-1</sup> (Tabela 2). Adicionais estudos são necessários para avaliar possíveis alterações nas propriedades funcionais das culturas de *L. plantarum* isoladas.

Tabela 2: População de microrganismos, após liofilização e estocagem a – 20°C

Microrganismo	População microbiana após liofilização e estocagem a – 20°C (valores médios Log UFC . mL <sup>-1</sup> ± DP)		
	inicial	4 semanas	6 meses
<i>L. plantarum</i> AJ2	8,89 ± 0,2	9,12 ± 0,6	8,95 ± 0,1
<i>L. plantarum</i> AL2	9,86 ± 0,7	9,92 ± 0,2	9,89 ± 0,2
<i>L. plantarum</i> R2	9,23 ± 0,3	8,78 ± 0,3	9,20 ± 0,7
<i>L. plantarum</i> AF5	9,58 ± 0,1	9,65 ± 0,8	9,63 ± 0,6
<i>L. plantarum</i> AD3	9,86 ± 0,2	9,89 ± 0,3	9,81 ± 0,1
<i>L. plantarum</i> AN3	9,76 ± 0,2	9,79 ± 0,2	9,74 ± 0,5
<i>L. plantarum</i> AM2	9,39 ± 0,1	9,25 ± 0,5	8,97 ± 0,3

Em relação à atividade antagonística, as bactérias ácido lácticas originalmente isoladas de salames tradicionais são, provavelmente, as melhores candidatas para a segurança microbiológica destes produtos, porque elas são bem adaptadas às condições do salame, com maior potencial competitivo em relação a bactérias ácido lácticas isoladas de outras origens (AMMOR et al., 2005b). O principal mecanismo pelo qual as bactérias ácido lácticas inibem seus competidores é a produção de ácido láctico, ácido acético e a possibilidade da produção de bacteriocinas (LÜCKE, 2000). Alguns outros metabólitos produzidos por bactérias ácido lácticas têm apresentado inibição para bactéria Gram-negativa *in vitro*, mas, segundo Lücke (2000), é improvável que eles serão explorados para melhorar a segurança e estabilidade de carnes porque: uns não são formados em quantidades suficientes (por exemplo, reuterin), alguns interferem nas propriedades sensoriais (por exemplo, diacetil e peróxido de hidrogênio) e outros requerem mais estudos (por exemplo, ácido benzóico).

Bactérias ácido lácticas bacteriogênicas têm apresentado efetiva inibição do crescimento de patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium difficile* (HOLZAPFEL, GEISEN & SHILLINGER, 1995). Conforme Papamanoli et al. (2003), sete culturas de *L. plantarum* isoladas de salames naturalmente fermentados, 71% das culturas apresentaram atividade antimicrobiana contra culturas de *Listeria monocytogenes*, 29% inibiram o crescimento de duas culturas de *Staphylococcus aureus*, mas

nenhuma inibição foi observada para culturas de *Escherichia coli* 0157:H7 e *Bacillus cereus*.

No presente estudo, todas as sete culturas isoladas, exibiram atividade antagonística contra *Listeria monocytogenes* NTC 098630; 4 culturas inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 e *Staphylococcus xylosus* 29971; 3 culturas inibiram o crescimento da cultura *S. xylosus* isolada e nenhuma inibição foi observada contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade antagonística das culturas de *L. plantarum* isoladas

Culturas de referência	Culturas de <i>L. plantarum</i> isoladas						
	AI2	AJ2	AD3	R2	AM2	AN3	AF5
<i>S. xylosus</i> ATCC 29971	+	-	+	-	-	+	+
<i>S. xylosus</i> isolada	-	-	+	-	-	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 12598	-	+	-	+	+	-	+
<i>E. Coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> NTC 098630	+	+	+	+	+	+	+

Símbolos correspondentes ao observado no ensaio de difusão:

(+), larga zona de inibição (largura  $\geq 3,0$  mm) e (-), nenhuma zona de inibição (largura  $< 3,0$  mm)

Conforme os resultados observados, as culturas *L. plantarum* isoladas apresentaram atividade antagonística, mas é necessário posteriores estudos a respeito da natureza química, classificação e caracterização dos compostos produzidos. Para a seleção de um microrganismo como cultivo iniciador, é também importante considerar a não-inibição de cocos Gram-positivos, catalase-positivos (como por exemplo, *S. xylosus*), porque esses microrganismos participam de significativas reações que promovem a qualidade do salame fermentado.

#### 4 Conclusão

As culturas de *L. plantarum* isoladas apresentaram efetivas propriedades tecnológicas como cultivos iniciadores, mas é importante desenvolver estudos adicionais sobre as propriedades tecnológicas dessas culturas em produtos cárneos fermentados.

## Agradecimentos

Este trabalho teve apoio da EMBRAPA SUÍNOS e AVES, UNIJUÍ e UFSC.

## Referências

1. AMERICAN MEAT INSTITUTE. *Beef, Veal and Lamb Operations*, 4<sup>th</sup> ed. Institute of Meat Packing, Univ. of Chicago, Chicago, 1945.
2. AMMOR, S. et al. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology*, v. 22, p. 529 – 538, 2005a.
3. AMMOR, S. et al. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology*, v. 22, p. 373 - 382, 2005b.
4. ANDRIGUETTO, C.; ZAMPESE, L.; LOMBARDI, A. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meats plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, p. 26 – 30, 2001.
5. BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 12, p. 253 – 272, 1993.
6. CAMMACK, R. et al. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1411, p. 475 – 488, 1999.
7. DEIBEL, R.H. Technology of fermented semi-dried and dried sausage. *Proc. Meat Industry Research Conferences*, March 23-24, Am. Meat Institute Foundation, Chicago, IL, 1974.
8. DROSINOS, E.H. et al. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, v. 24, p. 260 - 270, 2007.
9. GEISEN, R.; LÜCKE, F-K.; KRÖCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch*, v. 72, n. 6, p. 894 - 898, 1992.

10. GOFFIN, P. Lactate racemization as a rescue pathway for supplying D – lactate to the cell wall biosynthesis machinery in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, v.187, p. 6750 – 6761, 2005.
11. GRAVESEN, A. et al. Differential inactivation of *Listeria monocytogenes* by D – and L – lactic acid. *Letters in Applied Microbiology*, v. 39, p. 528 – 532, 2004.
12. GRAY J. I.; PEARSON A.M. Cured meat flavor. In: *Advances in food research academic Press*, v. 29, p. 1 - 86, 1984.
13. HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of food Microbiology*, v. 24, p. 343 – 362, 1995.
14. HOLZAPFEL, W. Use of starter cultures in fermentation on household scale. *Food Control*, v. 8, n. 5/6, p. 241 – 258, 1997.
15. HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of food Microbiology*, v. 75, p. 197 – 212, 2002.
16. HUGAS, M. et al. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of food Microbiology*, v. 18, p. 107 – 113, 1993.
17. JESSEN, B. Starter cultures for meat fermentation. In: Campbell – Platt; Cook, P. E. *Fermented meats*. London: Blackie Academic Professional, p. 130 – 159, 1995.
18. KLANDER, O., WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. Beijerinck, 1901. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 2, 1986.
19. KRAMLICH, W. E.; PEARSON, A. M.; TAUBER, F. W. *Processed Meats*. AVI Publ. Co., Westport, Connecticut, 1973.
20. LEE, J-Y; KIM, C-J; KUNZ, B. Identification of lactic acid bacteria isolated from *kimch* and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Science*, 72, 437 – 445, 2006.
21. LEROY, F.; VERLUYTEN, J. VUYST, L. D. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 106, p. 270 – 285, 2006.

22. LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n.6, p. 1983 – 1688, 1991.
23. LIU, S.-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, v. 83, p. 115 – 131, 2003
24. LÜCKE, FRIEDRICH-KARL. Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken. *Band 5 der Kulmbacher Reihe*, S, p. 85 – 102, 1985.
25. LÜCKE, FRIEDRICH-KARL Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, v. 56, p. 105 – 115, 2000.
26. MARCO, A.; NAVARRO, J. L.; FLORES, M. The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. *Meat Science*, v. 73, p. 660 – 673, 2006.
27. MORETTI, V. M. et al. Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat science*, v. 66, p. 845 – 854, 2004.
28. OLESEN, P. T.; MEYER, A. S. STAHNKE, L. Generation of flavour compounds in fermented sausages – the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, v. 66, p. 675 – 687, 2004.
29. OKEREKE, A.; MONTVILLE, T.J. Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, v.54, n.5, 349 – 353, 1991.
30. PAPADIMA, S. N. et al. Chemometric model for describing Greek traditional sausages. *Meat science*, v. 51, p. 271 – 277, 1999.
31. PAPAMANOLI, E. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, v. 65, p. 859 – 867, 2003.
32. RANTSIOU, K. et al. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*, v. 22, p. 19 – 28, 2005.
33. ROVIRA, A. et al. Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages. *Microbiologia*, 13, 201 - 208, 1997.

34. SAARELA, M. et al. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1477 – 1482, 2006.
35. SAMELIS, J. et al. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiology*, v. 11, p. 447 – 460, 1994.
36. SARKAR, P. K.; BANERJEE, S. Antibacterial activity of lactic acid bacterial isolates obtained from natural habitats. *Journal Food Science Technology*, v.33, n.3, p. 231 – 233, 1996.
37. SAWITZKI, M.C. et al. Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *L. plantarum* isolated from naturally fermented sausages. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 547 – 552. 2007.
38. SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F-K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*, v. 4, p. 199 – 208, 1987.
39. SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F-K. Einsatz von milchsäurebakterien als schutzkulturen bei fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, v. 69, p. 879 – 882, 1989.
40. SHU, H-C.; HÅKANSON, H.; MATTIASSON, B. On-line monitoring of D - lactic acid during a fermentation process using immobilized D - lactate dehydrogenase in a sequential injection analysis system. *Analytica Chimica Acta*, v. 300, p. 277-285, 1995.
41. SMITH, J. L.; PALUMBO, S. A. Use of Starter Cultures in Meats. *Journal of Food Protection*, v. 46, n. 11, p. 997 - 1006, 1983.
42. TOLDRÁ, F. *Implicaciones de la reducción de nitratos y nitritos en el jamón curado*. In: III Congreso mundial del jamón, 2005.
43. XU, J.; VERSTRAETE, W. Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 56, p. 504 – 507, 2001.
44. ZHANG, D. L. et al. D – lactic acidosis secondary to short bowel syndrome. *Postgraduate Medical Journal*, v.79, p. 110 -112, 2003.
45. WIRTH, F. Restricting and dispensing with curing agents in meat products. *Fleischwirtschaft*, v. 71, p. 1051 – 1054, 1991.

46. WOLF, G.; HAMMES, W. P. Effect of hematin on the activities of nitrite reductase and catalase in lactobacilli. *Archives of Microbiology*, v. 149, p. 220 – 224, 1988.
47. ZANARDI, E. et al. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*, v. 66, p. 415 – 423, 2004.
48. ZHANG, et al. D-lactic acidosis secondary to short bowel syndrome. *Postgraduate Med*, v.79, p. 110 -112, 2003.

***Lactobacillus plantarum* AJ2 isolado de salames artesanais naturalmente fermentados e seus efeitos nas propriedades tecnológicas do salame tipo Milano**

Maristela Cortez Sawitzki<sup>7\*</sup>; Ângela Maria Fiorentini<sup>1, 2</sup>; Teresinha Marisa Bertol<sup>3</sup>;  
Anildo Cunha Júnior<sup>3</sup>; Ermani S. Sant'Anna<sup>1</sup>

Aceito para publicação: Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos (jan/2007)

**Resumo**

*L. plantarum* AJ2 foi isolado de salame naturalmente fermentado, fabricado na região Sul do Brasil e inoculado em salame tipo Milano. A cultura láctica apresentou habilidade para crescer no produto, promover a redução do pH nos primeiros sete dias de fermentação/maturação e dos níveis residuais de nitrito e nitrato, assim como menores valores de peróxidos e TBARS. O salame inoculado teve maior intensidade de brilho e da cor vermelha, mas, não apresentou diferenças significativas na composição geral e nas transformações químicas dos ácidos graxos livres, em relação ao controle.

**Palavras chave:** *L. plantarum*; propriedades tecnológicas; salame tipo Milano

**Abstract**

*L. plantarum* strain AJ2 was isolated from naturally fermented sausage manufactured in the South region of Brazil and inoculated in the Milano-type salami. The lactic culture exhibited ability to grow in the product, to decrease pH in the first seven days of fermentation/maturation and residual level of nitrite and nitrate, as well as, values of peroxide and TBARS. The inoculated sausage had highest intensity of bright and red color, but did not show difference in the chemical composition and in the chemical changes of the free fatty acids, compared to control.

**Keywords:** *L. plantarum*; technological properties; Milano – type salami.

---

<sup>1</sup> Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, CEP: 880034-001 - Florianópolis, SC – Brasil.

<sup>2</sup> Depto. de Biologia e Química – UNIJUÍ – RS 344, km 39, CEP: 98900-000 - Santa Rosa, RS – Brasil.

<sup>3</sup> EMBRAPA SUÍNOS e AVES, BR 153 km 110 Vila Tamanduá, CEP: 89700-000 – Concórdia, SC – Brasil.

\* A quem a correspondência deverá ser enviada.

## 1 Introdução

O salame é um característico produto cárneo fermentado, processado em grande escala por várias indústrias na região Sul do Brasil, onde a maioria utiliza cultivos iniciadores no processamento destes produtos e o processo de fermentação/maturação é controlado. Entretanto, na mesma região, também ocorre a manufatura de salame em pequenas agroindústrias e sistemas de agricultura/produção familiar. Na produção artesanal de salames, gordura e carne suína são misturadas com sal, agentes de cura, açúcar ou especiarias, embutido em tripas e submetidos à fermentação/maturação em condições ambientais (25 – 30°C) por poucas semanas. Os salames são fermentados espontaneamente pela microbiota natural, sem a adição de cultivos iniciadores. Neste caso, o processo fermentativo não é controlado.

A fermentação espontânea de salames é caracterizada principalmente pela participação de bactérias ácido lácticas; cocos Gram-positivos, catalase-positivos; leveduras e bolores (BUCKENHÜSKES, 1993). As espécies de *L. curvatus*, *L. plantarum* e *L. sakei* têm sido descritas como as espécies de *Lactobacillus* dominantes na fermentação de salames (HUGAS et al., 1993; PAPAMANOLI et al., 2003; SAMELIS et al., 1994 e SCHILLINGER & LUCKE, 1987). Ammor et al. (2005) investigaram a microbiota de salames produzidos em pequena escala e observaram que, entre as bactérias ácido lácticas isoladas, *L. sakei* foi a espécie predominante. Para Drosinos et al. (2007) *L. plantarum* foi a espécie dominante (45,6%) entre as 300 culturas de bactérias ácido lácticas isoladas durante o período de fermentação e maturação de salames tradicionais na região sudeste da Grécia.

A maioria de pequenos fabricantes, principalmente em países em desenvolvimento, continua usando o tradicional sistema da espontânea fermentação de salames, sem a adição de cultivos iniciadores. Entretanto, é importante considerar que a fermentação pela natural microbiota pode algumas vezes falhar, causando prejuízos à qualidade dos produtos e, também, possibilitando a sobrevivência de microrganismos deteriorantes, patogênicos e/ou toxigênicos. Por essa razão, a adição de cultivos iniciadores tem sido

recomendada (ANDRIGUETTO, ZAMPESE & LOMBARDI, 2001; HOLZAPFEL 2002; SANTOS et al., 1998).

A inoculação da massa de salame com cultivos iniciadores compostos de selecionadas bactérias ácido lácticas, por exemplo, lactobacilos homofermentativos e/ou pediococos e cocos Gram-positivos, catalase-positivos (*Staphylococci* e *Kokuriae*), promove a segurança, a qualidade e a padronização das propriedades do produto, incluindo aroma, cor e menor tempo de maturação (LEROY, VERLUYTEN & VUYST, 2006; RANTSIOU et al., 2005). No referido consórcio de microrganismos, as bactérias ácido lácticas têm função relevante, pois promovem a estabilidade microbiana e as propriedades tecnológicas desejáveis no produto final, em razão da produção dos ácidos láctico e acético, os quais promovem o decréscimo do pH do meio (DROSINOS et al., 2007). *Staphylococcus* coagulase-negativo como *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus carnosus* podem ser utilizados promover o sabor de produtos cárneos fermentados (BERDAGUÉ et al., 1993).

Cultivos iniciadores contendo bactérias ácido lácticas de origem da microbiota da carne são hábeis para adaptar-se à ecologia da fermentação cárnea e para a tecnologia específica de produção (ANDRIGUETTO, ZAMPESE & LOMBARDI, 2001; HUGAS et al., 1993). A eficiência de cultivos iniciadores cárneos comerciais, quando aplicados em um tipo de salame, não necessariamente deverá ser a mesma para outro tipo de produto, em outro local, sob diferentes condições de produção (LEROY, VERLUYTEN & VUYST, 2006).

Considerando a importância das bactérias ácido lácticas na fermentação de produtos cárneos e a espécie *L. plantarum* comumente presente na microbiota natural de salames, o objetivo do presente trabalho foi determinar os efeitos da cultura *L. plantarum* AJ2 nas propriedades tecnológicas do salame tipo Milano. Optou-se pelo salame tipo Milano porque é um produto comumente fabricado e comercializado na região Sul do Brasil e apresenta alta concentração de lipídios (visando observar transformações nos ácidos graxos livres).

## 2 Material e métodos

### 2.1 Obtenção e preparo da cultura láctica para aplicação no salame

A cultura *L. plantarum* AJ2 utilizada neste estudo foi selecionada entre culturas de *L. plantarum* (codificadas como AJ2, AL2, R2, AF5, AD3, N3 e AM2), as quais apresentaram efetivas propriedades tecnológicas como cultivos iniciadores conforme Buckenhüskes (1993); Holzapfel (2002); Lee, Kim & Kunz (2006) e Saarela et al. (2006). As sete culturas foram selecionadas considerando um prévio estudo de caracterização morfológica, fenotípica e molecular de dez culturas de bactérias ácido lácticas isoladas e caracterizadas por Sawitzki et al. (2007).

A cultura *L. plantarum* AJ2 foi obtida como cultivo iniciador por fermentação em um fermentador, concentrada por centrifugação, suspensas em leite em pó reconstituído 10 % (m . v<sup>-1</sup>) como crioprotetor (1/50 do volume do caldo original), congelada a - 20°C, liofilizada e armazenada a -20 °C. Para aplicação no salame, a cultura liofilizada foi suspensa em água destilada, esterilizada, ausente de cloro e adicionada à massa cárnea, a fim de obter a concentração inicial 10<sup>9</sup> UFC. g<sup>-1</sup> de massa cárnea, conforme Smith & Palumbo (1983) e Geisen, Lücke & Kröckel (1992).

### 2.2 Manufatura do salame

O salame foi manufaturado sob condições da tradicional formulação do salame tipo Milano, em indústria local. A formulação do salame incluiu 53,5% de carne suína, 17,8% de carne bovina, 17,8% de retalho suíno gordo, 2,8% de sal (NaCl), 0,45% de sal de cura (contendo nitrato e nitrito de sódio), açúcar, eritorbato de sódio, vinho tinto e especiarias. Após cortar a carne e a gordura (ambas congeladas) em um cutter, foram misturados os ingredientes à massa cárnea e dividida a mesma em duas porções. O cultivo iniciador *L. plantarum* AJ2 foi adicionado em uma das porções cárneas (10<sup>9</sup> UFC. g<sup>-1</sup>) e a outra porção foi mantida como controle.

Cada porção da mistura cárnea (aproximadamente 400 g) foi embutida em tripas sintéticas (70 mm de diâmetro e aproximadamente 45 cm de comprimento) e levada para maturar em câmara a 25°C com 95% de umidade relativa do ar por 24h. Em seguida, a temperatura e a umidade foram reduzidas conforme as condições normais de processamento da fábrica, que são as seguintes: 24°C / 93% (no segundo dia), 23°C / 90% (no terceiro dia), 22°C / 85% (no quarto dia), 21°C / 80% (no quinto dia), 20°C / 75% (no sexto dia) e 18°C / 75% (no sétimo dia, mantida esta condição até completar 42 dias de maturação do produto).

Em 0, 7, 14, 21, 28 e 42 dias de maturação, amostras de salames (inoculado e controle) foram selecionadas aleatoriamente (por sorteio) para análises microbiológicas e físico-químicas. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os valores obtidos tiveram os respectivos desvios padrões calculados.

### 2.2.1 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas das amostras de salame seguiram conforme APHA (1992) e constaram da contagem estimada da população de bactérias ácido lácticas; cocos Gram-positivos, catalase-positivos; microrganismos deteriorantes e patogênicos. 25,0 g de cada amostra foram adicionados em 225,0 mL de água peptonada estéril 0,1% ( $m \cdot v^{-1}$ ) (Oxoid) e homogeneizados em *Stomacher* (ITR, model MK 1204) por 2 minutos. Diluições decimais subsequentes foram preparadas utilizando o mesmo diluente e a amostra de apropriada diluição foi inoculada em apropriado meio de cultura seletivo e incubada sob específica condição: De Man, Rogosa e Sharp Agar – MRS (Oxoid), para bactérias ácido lácticas (a 30°C por 72h), condicionadas as placas em uma jarra de anaerobiose (Anaerobar Assembly – CODE AG25 – Oxoid), com atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub> (Anaerogen AN 2,5 L – Oxoid); Brain Heart Infusion Agar - BHI (Oxoid), para *Micrococaceae* (a 35°C por 48h); Plate Count Agar – PCA (Oxoid), para microrganismos aeróbios mesofílicos totais (a 30°C por 72h); Glucose Potato Agar (Oxoid), suplementado com tetraciclina (1 mg . mL<sup>-1</sup>, Sigma), para mofo e leveduras (a 25°C por 7 dias); Brilliant Green Bile (2%) broth – BGGB (Oxoid), para coliformes totais (método NMP a 37°C por 48h); E.C. broth (Oxoid), para coliformes termotolerantes (método NMP a 42°C por 24h); Baird-

Parker Agar (Oxoid), adicionado de emulsão ovo e telurito (Oxoid), para *Staphylococci* coagulase-positivo (a 37°C por 48h); Perfringins Agar Base - TSC (Oxoid), para *Clostridium* sulfito redutor (incubado sob anaerobiose a 37°C por 48h).

Para a detecção de *Salmonella* ssp, o pré-enriquecimento foi realizado suspendendo 25,0 g da amostra em 225,0 mL de água peptonada tamponada (1%) (m . v<sup>-1</sup>) (Merck) e incubada a 37°C por 16h. O enriquecimento seletivo foi realizado transferindo 0,1 mL do meio pré-enriquecido para 10,0 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis (Merck) e para 10,0 mL do caldo base Selenite Cystine (Oxoid), respectivamente. Em seguida, todos os tubos foram incubados a 42°C por 24h. Após a incubação, cada caldo seletivo enriquecido foi semeado em modificado BPLS agar (Merck) e XLD agar (Merck). Em seguida, todas as placas foram incubadas a 37°C por 24h.

Para detecção de *Listeria* ssp, seletivo enriquecimento foi realizado adicionando 25,0 g da amostra em 225,0 mL de caldo Fraser (Merck) seguido da incubação a 30°C por 24h. Então, 0,1 mL da cultura enriquecida foi estriado sobre agar PALCAM (Merck) e incubado a 30 °C por 48 h.

Os resultados da contagem da população microbiana foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC . g<sup>-1</sup>) ou número mais provável por grama de amostra (NMP . g<sup>-1</sup>).

## 2.2.2 Análises físico-químicas

Cada amostra foi triturada em um multiprocessador (Tecnal Turratec TE-102), congelada a - 20 °C e liofilizada (Virtis Unitop/1000L), para posteriores análises.

Após 42 dias de maturação, a composição geral aproximada de cada amostra, umidade, proteína bruta (nitrogênio Kjeldahl), lipídios (extrato etéreo), cinzas (forno mufla) e sal (NaCl), foi determinada conforme AOAC (2002).

As concentrações de ferro e sódio foram determinadas conforme Granadillo et al. (1995). Aproximadamente 500 mg de amostra foram colocados em um tubo de digestão (22 x 250 mm), adicionados de 6,0 mL de HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub> 8:1 (v . v<sup>-1</sup>) e aquecido conforme o seguinte: 90°C . 30 min<sup>-1</sup>, 160°C . 40 min<sup>-1</sup> (rampa de 10°C . min<sup>-1</sup>), 180°C . 20 min<sup>-1</sup>; depois, resfriado sob temperatura ambiente até o

desaparecimento de vapor branco. Após a digestão, foram adicionados 2,5 mL de  $\text{HCl}_{(6M)}$  e completado o volume para 25 mL com água deionizada. A quantidade de ferro (Fe) foi determinada por espectrometria de absorção atômica: amostras diluídas foram diretamente aspiradas para o espectrômetro (Varian SpectrAA 220) equipado com lâmpada cátodo-oco, usando chama de ar/acetileno. A quantidade de sódio (Na) foi determinada em fotômetro de chama (Micronal B262). Ambos, ferro e sódio, foram quantificados conforme parâmetros operacionais recomendados pelo fabricante dos respectivos equipamentos.

Medidas de cor foram determinadas por método colorimétrico, utilizando o colorímetro (Chroma Meter CR-300, Minolta) e os padrões de cor CIE  $L^*$  (lightness - brilho),  $a^*$  (redness - vermelho) e  $b^*$  (yellowness - amarelo), com leituras realizadas em três pontos da superfície de duas fatias (10 mm de espessura) de cada amostra. Ao todo, seis medidas foram realizadas para cada amostra.

O monitoramento das transformações físico-químicas desenvolvidas durante a fermentação e a maturação do salame foi realizado em intervalos de 7 dias (durante 42 dias), determinando-se: umidade, atividade de água, valor de pH, acidez, concentração de nitratos e nitritos, valor de peróxidos, valores de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e ácidos graxos livres (saturados e insaturados).

A atividade de água ( $A_w$ ) foi determinada através do equipamento Testo 400 CE (Testo GMBH & CO, Brasil). O valor de pH foi observado através de potencial elétrico usando um pHmetro digital (Digimed) conectado com um eletrodo submerso na amostra em suspensão (10 g de amostra homogeneizada em 90 mL de água destilada/deionizada em temperatura equilibrada para 25°C). A acidez foi estimada como percentual de ácido láctico por peso da amostra (1 mL de  $\text{NaOH}_{(0,1N)} = 0,0090$  g ácido láctico) (AOAC, 2002). A concentração de nitrato e nitrito foi determinada conforme AOAC (2002). A concentração de hidroperóxidos foi estimada determinando o valor de peróxidos e expressa como  $\text{mEqv O}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$  de lipídios (AOAC, 2002). Valores de TBARS foram determinados utilizando o método de destilação conforme Tarladgis et al. (1964), modificado por Crackel et al. (1988), seguindo as recomendações de Shahidi et al. (1985) quanto à adição

de sulfanilamida para amostras que contêm nitrito e, após, foi realizado o teste de recuperação conforme Torres et al. (1989).

Para análises de ácidos graxos livres, lipídios foram extraídos de cada amostra, conforme Folch, Less e Stanley (1957), e, a partir de uma alíquota de 10 mL, foi determinada gravimetricamente a concentração total de lipídios. Posteriormente, uma alíquota contendo aproximadamente 100 mg foi esterificada para subsequente determinação da composição dos ácidos graxos por cromatografia gasosa. A esterificação foi realizada com uma solução de cloreto de amônio e ácido sulfúrico em metano, conforme Hartman & Lago (1973).

Ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em cromatógrafo gasoso - CG (Modelo GC-2010, Shimadzu), acoplado a um espectrômetro de massa (Modelo QP2010, Shimadzu), usando uma coluna capilar MS-5 (30 m; 0,25 mm I.D. x 0,25  $\mu\text{m}$  film thickness) (Restec Rtx). As condições de operação do cromatógrafo gasoso foram as seguintes: temperatura do forno em 150°C elevando-se a 220°C (2 °C . min<sup>-1</sup>), mantida por 15 minutos; temperatura do injetor a 250°C, modo de injeção split (100:1) e volume de injeção igual a 1,0  $\mu\text{l}$  de amostra. Hélio ultrapuro (5.0) foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 1,0 mL . min<sup>-1</sup>. As condições do espectrômetro de massa foram as seguintes: impacto eletrônico com energia do elétron a 70 eV, modo scan com  $m/z$  inicial de 40 u e final 400 u, temperatura da fonte de íons a 220°C e temperatura de interface a 250°C.

Os ácidos graxos livres foram identificados por comparação dos respectivos espectros de massa com a base de dados da biblioteca NIST05, considerando-se uma similaridade superior a 90%. Os resultados foram expressos em percentual de área normalizada. A estimativa das quantidades aproximadas dos ácidos graxos foi determinada por normalização e transformação do percentual de área em g . 100 g<sup>-1</sup> de amostra, utilizando um fator de conversão para lipídios (F), cujo valor para produtos cárneos é de 0,956, de acordo com Holland et al. (1994).

### 2.2.3 Avaliação sensorial

O método utilizado para a avaliação sensorial do salame inoculado com a cultura *L. plantarum* AJ2 e do controle foi o de análise subjetiva, classificado

como de ordenação de preferência (ABNT/NBR12994/1993 e NBR13170/1994). 70 pessoas participaram do teste, o qual consistiu em apresentar as amostras-testes para que fossem degustadas, ordenadas em seqüência de maior preferência para menor preferência e registrado a opinião em um formulário específico para análise sensorial. Todos os participantes assinaram o TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em conformidade com o Projeto 189/05: Desenvolvimento de cultivos iniciadores para a produção de embutidos cárneos artesanais, aprovado em 27 de junho de 2005, pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 2.2.4 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada através do teste – t, utilizando o programa STATISCA, versão 6.0.

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Propriedades microbiológicas

A população de bactérias ácido lácticas aumentou para o valor médio de 6,52 ( $\pm 0,12$ ) Log UFC  $\cdot g^{-1}$  na amostra controle e 8,54 ( $\pm 0,23$ ) Log UFC  $\cdot g^{-1}$  na amostra inoculada, desde o início da fermentação/maturação até o final do processo de maturação (42 dias) (Figuras 1 e 2). A contagem de bactérias ácido lácticas foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no salame inoculado quando comparado com a contagem de bactérias ácido lácticas no salme controle. Esses resultados são um indicativo de que a cultura *L. plantarum* AJ2 apresentou potencial para se desenvolver no salame tipo Milano. Bactérias ácido lácticas originalmente isoladas de salames tradicionais são provavelmente as melhores candidatas para prover a segurança microbiológica desses alimentos, porque elas são bem adaptadas às condições do salame e, portanto, mais competitivas que bactérias ácido lácticas de outras fontes/origens (PAPA et al., 1993; AMMOR et al., 2006).

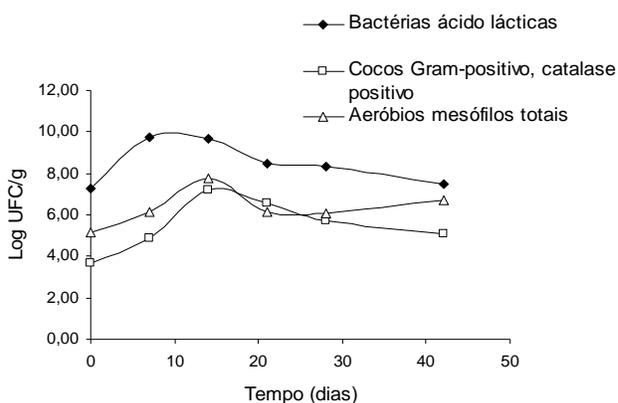


Figura 1: População microbiana no salame inoculado com *L. plantarum* AJ2, durante 42 dias de fermentação/maturação.

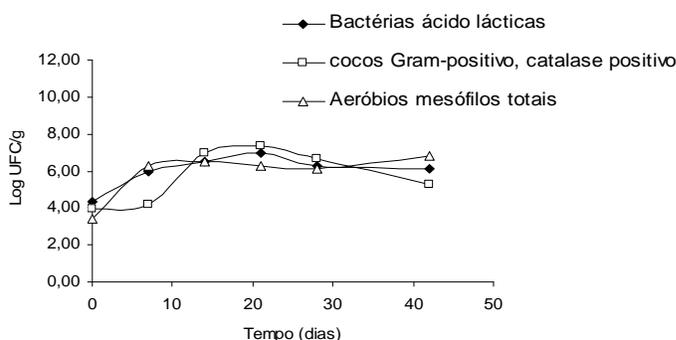


Figura 2: População microbiana no salame controle, durante 42 dias de fermentação/maturação.

Segundo Chevalier et al. (2006); Drosinos et al. (2007); Mauriello et al. (2004); Montel et al. (1993); Papamanolli et al. (2003) e Sawitzki & Terra (2000), a população de bactérias ácido lácticas em salames naturalmente fermentados, nos primeiros dias de fermentação, apresentou resultado menor ou igual a 4,5 Log UFC . g<sup>-1</sup> de massa cárnea. No presente estudo, obteve-se resultado similar. A natural população de bactérias ácido lácticas, próxima de 4,0 Log UFC.g<sup>-1</sup>, pode ser insuficiente no processo fermentativo, porque, conforme Smith & Palumbo (1983), é necessária a adição de microrganismos desejáveis em produtos cárneos fermentados, na concentração de 7,0 – 9,0 Log UFC . g<sup>-1</sup>, para inibir os microrganismos indesejáveis e prevenir ou reduzir falhas na fermentação. Outro

aspecto a ser considerado é o de que cultivos iniciadores adicionados intencionalmente são selecionados e a microbiota presente, bem como seus efeitos, são previsíveis.

A população inicial de cocos Gram-positivos, catalase-positivos, aumentou para 6,60 Log UFC . g<sup>-1</sup> na amostra controle e para 7,34 Log UFC . g<sup>-1</sup> na amostra inoculada nos primeiros 21 dias de fermentação/maturação, decrescendo para 5,08 e 5,30 Log UFC . g<sup>-1</sup>, respectivamente, no produto final (42 dias de maturação). Esses resultados sugerem que *L. plantarum* AJ2 não inibe o desenvolvimento de *Micrococcus/Staphylococcus*. Para a seleção de bactérias ácido lácticas como cultivos iniciadores cárneos, também é importante garantir a não-inibição de cocos Gram-positivos, catalase-positivos (por exemplo, *S. xylosus*). Segundo Geisen, Lücke & Kröckel (1992) estes microrganismos têm influência desejável nos produtos cárneos, porque eles têm atividade nitrito e nitrito redutase, atividade lipolítica, consumo de oxigênio e atividade catalase, com efeitos na cor, *flavor* e decréscimo de rancidez no produto. Para assegurar a qualidade sensorial de salames fermentados, é necessária a contribuição de cocos Gram-positivos, catalase-positivos (HUGAS & MONFORT, 1997).

Em ambas as amostras (produto final) não foi observado potencial risco da presença de microrganismos deteriorantes, patogênicos e/ou toxigênicos (dados não apresentados). Estes resultados estão em conformidade com legislação brasileira e respectivos padrões microbiológicos sanitários exigidos para produtos cárneos maturados (BRASIL/ANVISA, 2001) e sugerem que, sob boas condições de higiene e boas práticas de fabricação é possível reduzir a contaminação de microrganismos indesejáveis.

### 3.2 Propriedades físico-químicas

Os resultados determinados para a composição química de ambos os salames, inoculado com *L. plantarum* AJ2 e controle, após 42 dias de fermentação e maturação dos mesmos, não apresentaram diferença significativa entre as amostras ( $p > 0,05$ ), com valores médios de: umidade 28,3%, extrato seco total 71,6%, cinzas 6,3%, gordura 29,4%, proteína bruta 32,8%, sal (NaCl) 4,95%, ferro (Fe) 1,6 mg . kg<sup>-1</sup>, sódio (Na) 2,88 % e atividade de água 0,826.

Estes resultados estão em conformidade com a legislação brasileira, regulamento técnico de identidade e qualidade do salame tipo Milano (BRASIL, 2000). As transformações físico-químicas que foram monitorados durante 42 dias de maturação de ambos os salames, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Transformações físico-químicas observadas no salame inoculado com *L. plantarum* AJ2 e no salame controle, durante os 42 dias de fermentação/maturação.

Propriedade Físico-química	Período de fermentação/maturação					
	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 42
Umidade (%)						
Inoculado	53,6 ± 0,27	42,0 ± 0,30	40,1 ± 0,33	39,0 ± 0,48	36,2 ± 1,02	28,2 ± 0,98
controle	52,4 ± 0,30	44,0 ± 0,28	41,7 ± 0,45	40,01 ± 0,53	35,4 ± 0,08	28,5 ± 0,10
Atividade de água						
Inoculado	0,954 ± 0,08	0,920 ± 0,17	0,903 ± 0,09	0,895 ± 0,11	0,858 ± 0,21	0,821 ± 0,09
Controle	0,963 ± 0,07	0,932 ± 0,35	0,906 ± 0,27	0,903 ± 0,13	0,87 ± 0,28	0,832 ± 0,31
Valor de pH						
Inoculado	5,60 ± 0,01	4,97 ± 0,03	5,20 ± 0,01	5,01 ± 0,04	5,07 ± 0,02	5,18 ± 0,06
Controle	5,68 ± 0,03	5,34 ± 0,07	5,38 ± 0,05	5,21 ± 0,08	5,20 ± 0,03	5,25 ± 0,06
Acidez (mL NaOH . g <sup>-1</sup> )						
Inoculado	0,26 ± 0,03	0,57 ± 0,04	0,64 ± 0,02	0,79 ± 0,05	0,86 ± 0,01	1,00 ± 0,06
Controle	0,25 ± 0,01	0,51 ± 0,06	0,63 ± 0,08	0,66 ± 0,03	0,86 ± 0,03	0,86 ± 0,05
Nitrato (mg . kg <sup>-1</sup> )						
Inoculado	276,7 ± 0,97	156,8 ± 1,07	65,4 ± 0,80	33,9 ± 0,98	21,58 ± 0,86	11,32 ± 0,95
Controle	275,8 ± 1,10	178,4 ± 1,23	95,3 ± 0,97	67,4 ± 1,01	56,7 ± 0,76	48,9 ± 1,09
Nitrito ((mg . kg <sup>-1</sup> )						
Inoculado	117,8 ± 1,09	59,7 ± 0,56	26,28 ± 0,78	17,35 ± 1,12	8,29 ± 0,93	5,12 ± 0,86
Controle	118,5 ± 1,23	73,1 ± 1,10	44,7 ± 1,03	36,9 ± 0,89	32,5 ± 0,09	29,7 ± 1,10
Peróxidos (mEq.kg <sup>-1</sup> )						
Inoculado	0,65 ± 0,04	0,59 ± 0,02	0,95 ± 0,05	1,44 ± 0,07	1,77 ± 0,06	2,03 ± 0,03
Controle	0,66 ± 0,02	0,95 ± 0,05	1,52 ± 0,03	2,23 ± 0,00	3,59 ± 0,06	3,89 ± 0,02
TBAS (mg MDA . kg <sup>-1</sup> )						
Inoculado	0,43 ± 0,03	1,11 ± 0,05	1,98 ± 0,04	1,58 ± 0,08	1,45 ± 0,06	1,32 ± 0,04
Controle	0,39 ± 0,02	1,13 ± 0,03	2,04 ± 0,07	1,55 ± 0,05	1,47 ± 0,08	2,28 ± 0,06

Os resultados dos valores de pH (primeiros 7 dias de fermentação) e do valor ácido (após 42 dias de maturação) foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Durante os primeiros 7 dias de fermentação, *L. plantarum* AJ2 apresentou potencial para a produção de ácido porque o valor de pH decresceu de 5,60 para

4,97 no salame inoculado, enquanto que no salame controle, o valor de pH decresceu de 5,68 para 5,34 (Figura 3). A acidificação em salames resulta na desnaturação de proteínas cárneas e na indução de reações necessárias para a formação da cor desejável e estabilidade do produto (BUCKENHÜSKES, 1993). Também decresce a capacidade de manter a água ligada e, conseqüentemente, é acelerada a maturação do produto (JESSEN, 1995). A acidificação da mistura cárnea em salames pode ser atingida pela adição de glucona-delta-lactona ou por fermentação. Em ambos os casos, segurança, maior vida de prateleira e melhor fatiabilidade do salame serão alcançadas, mas o sabor e aroma originais do produto somente serão obtidos pela fermentação (BUCKENHÜSKES, 1993).

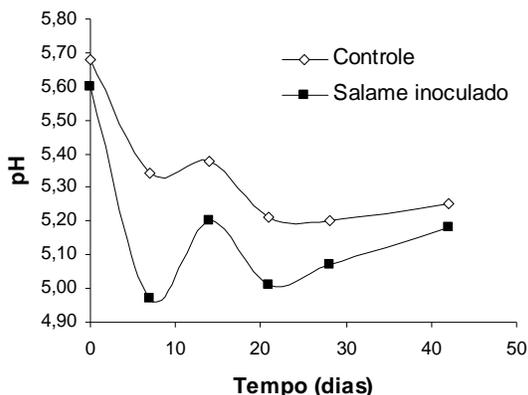


Figura 3: Valores de pH no salame inoculado com *L. plantarum* AJ2 e no salame controle, durante 42 dias de fermentação/maturação.

A habilidade das bactérias ácido lácticas, em particular os lactobacilos, para diminuir o pH, previne o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, promovendo a segurança e o maior tempo de armazenagem do produto cárneo (LÜCKE, 1985; SAMELIS et al., 1994). Um rápido decréscimo do pH para o valor próximo de 5,3 foi importante para a inibição de *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em produtos fermentados em temperatura próxima a 18°C (SCHILLINGER & LÜCKE, 1987).

Em ambas as amostras de salame, no produto final, a concentração de nitratos e nitritos estava em conformidade com a legislação brasileira (BRASIL, 1998) a qual limita em 150 mg . kg<sup>-1</sup> a concentração máxima de nitrito e 300 mg . kg<sup>-1</sup>, a concentração máxima de nitrato em carnes e produtos cárneos. Nitrato e nitrito

ocorrem na dieta humana a partir de diferentes origens e o cuidado com os referidos sais é em razão de que, em determinadas concentrações, apresentam riscos de provocar doenças como hipertensão e carcinogênese, além da possibilidade do efeito tóxico, ocorrência de metemoglobinemia, principalmente em crianças (BRADBERRY, GAZZARD & VALE, 1994; CAMMACK et al., 1999; PAIK et al., 2005). No entanto, o risco potencial de nitratos e nitritos é contrabalanceado por seu único efeito protetor contra o desenvolvimento de bactérias toxigênicas como *Clostridium botulinum* (CAMMACK et al., 1999).

Nitratos e nitritos têm importantes funções em produtos cárneos: (1) contribuem para o *flavor* e cor vermelha, característicos do produto cárneo curado; (2) inibem o crescimento de microrganismos deteriorantes, patogênicos/toxigênicos, especialmente o *Clostridium botulinum*; (3) estabilizam a cor e (4) retardam o desenvolvimento da rancidez (CORNFORTH, 1996; GRAY & PEARSON, 1984; KILLDAY et al., 1988; OSADA et al., 2000; SANZ et al., 1997; WOODS, WOODS & GIBBS, 1990). O nitrato é uma fonte de nitrito e o uso de nitrato é interessante porque o mesmo promove o *flavor*, comparado ao nitrito (OLESEN, MEYER & STAHNKE, 2004; WIRTH, 1991).

Após 42 dias de maturação, os valores de nitratos e nitritos (Tabela 1), bem como os valores para os padrões de cor (descritos a seguir), no salame inoculado foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em relação ao salame controle. A cultura *L. plantarum* AJ2 apresentou potencial efeito na redução dos níveis de nitratos/nitritos e maior intensidade de brilho e coloração vermelha no salame inoculado. Considera-se que as condições de pH no salame inoculado contribuíram para este fato. A nitrosilmioglobina em produtos cárneos curados (responsável pela característica cor vermelha desses produtos) é formada, sob condições ácidas, pela redução do nitrito a monóxido de nitrogênio e reação deste com a mioglobina (CHASCO, LIZASO & BERIAIN, 1996; MÖLLER et al., 2003; WIRTH, 1987).

Os resultados observados para os parâmetros de cor *lightness* (valor  $L^*$  - brilho), *redness* (valor  $a^*$  - vermelho) e *yellowness* (valor  $b^*$  - amarelo) no salame inoculado, foram os seguintes:  $L^* = 49,79 \pm 1,17$ ;  $a^* = 16,30 \pm 1,19$  e  $b^* = 6,81 \pm 0,29$ . No salame controle, foram:  $L^* = 42,27 \pm 1,21$ ;  $a^* = 13,59 \pm 0,81$  e  $b^* = 8,06 \pm 0,61$ . Valores similares para  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  em salames fermentados (com

aproximadamente 30% de gordura e 40 dias de maturação) foram observados por Chasco, Lizaso & Beriain (1996); Dellaglio et al. (1996), Papadima & Bloukas (1999) e Soyer, Ertas & Üzümcüoglu (2005).

Assim como a cor, o sabor e aroma fazem parte das propriedades organolépticas do produto e podem determinar o grau de aceitabilidade do mesmo. Na avaliação sensorial, o salame inoculado apresentou 60,71% de preferência em relação ao controle. Esse resultado sugere que a cultura *L. plantarum* AJ2 promoveu desejáveis propriedades organolépticas no salame.

Outro importante parâmetro de qualidade do salame é a composição dos lipídios. Conforme Gandemer (1999), os lipídios têm papel fundamental na qualidade do produto cárneo, incluindo o valor nutricional e as características sensoriais, principalmente o *flavor*. A composição dos lipídios e a extensão de lipólises e oxidação dos lipídios durante o processamento e maturação contribuem para a produção de ácidos graxos livres e para os componentes do *flavour* em produtos cárneos (DEMEYER; HOOZEE & MESDOM, 1974; HERNÁNDEZ, NAVARRO & TOLDRÁ, 1999; MOLLY et al., 1997; MOTTRAM, 1998).

No presente estudo, após 42 dias de fermentação/maturação, a composição total de ácidos graxos (% do total de metil ésteres), no salame inoculado e no controle foi, respectivamente, a seguinte: ácidos graxos saturados, 39,92% e 39,43 %; monoinsaturados, 46,99 % e 46,82 %; e polinsaturados, 9,27 % e 7,16 %. Resultados similares para a composição total de ácido graxos foram observados por Zanardi et al. (2002) em salames tipo Milano (exceto para polinsaturados que apresentaram 13.50 %). Campos et al. (2006) observou os valores de 39,0% de ácidos graxos saturados, 49,3% de ácidos graxos monoinsaturados e 11,2 % de ácidos graxos polinsaturados em salame tipo milano manufaturado com carne de suíno e salame tratado com 0,5 % de extrato etanólico de erva mate.

Respectiva composição individual de ácidos graxos livres (g .100 g<sup>-1</sup> de amostra) no salame inoculado e no controle, estão apresentados na tabela 2. Os resultados indicam que a cultura *L. plantarum* AJ2 não teve ação significativa na composição dos ácido graxos livres (  $p > 0.05$ ).

Tabela 2: Composição de ácidos graxos ( $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$  de amostra) no salame inoculado com *L. plantarum* AJ2 e no salame controle, durante 42 dias de fermentação/maturação.

Ácidos Graxos (g/100g)	Período de maturação					
	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 42
C14:0						
Inoculado	0,33 ± 0,22	0,38 ± 0,04	0,34 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,44 ± 0,09	0,42 ± 0,04
Controle	0,31 ± 0,06	0,35 ± 0,08	0,36 ± 0,00	0,40 ± 0,25	0,43 ± 0,03	0,42 ± 0,08
C16:0						
Inoculado	5,02 ± 0,37	6,00 ± 0,27	5,70 ± 0,19	6,14 ± 0,24	6,90 ± 0,85	6,76 ± 0,08
Controle	5,07 ± 0,16	5,69 ± 1,03	5,78 ± 0,25	6,16 ± 1,51	6,74 ± 0,06	7,13 ± 0,38
C17:0						
Inoculado	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,04
Controle	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,01
C18:0						
Inoculado	2,65 ± 1,76	3,17 ± 0,23	3,21 ± 0,18	3,33 ± 0,09	3,71 ± 0,04	3,57 ± 0,57
Controle	3,08 ± 0,05	3,12 ± 0,26	3,05 ± 0,50	3,32 ± 0,15	3,54 ± 0,06	3,88 ± 0,25
C16:1(9)						
Inoculado	0,40 ± 0,21	0,49 ± 0,04	0,46 ± 0,00	0,51 ± 0,01	0,54 ± 0,08	0,55 ± 0,06
Controle	0,39 ± 0,03	0,36 ± 0,06	0,47 ± 0,02	0,50 ± 0,09	0,53 ± 0,02	0,55 ± 0,01
C18:1(9)						
Inoculado	8,11 ± 1,72	10,01 ± 0,51	10,02 ± 0,16	10,34 ± 0,30	11,34 ± 0,06	11,50 ± 0,02
Controle	9,77 ± 0,01	9,82 ± 0,11	9,93 ± 0,34	10,32 ± 0,49	11,22 ± 0,04	12,12 ± 0,42
C18:1 (11)						
Inoculado	0,54 ± 0,07	0,68 ± 0,01	0,72 ± 0,01	0,72 ± 2,4	0,81 ± 0,01	0,84 ± 0,01
Controle	0,69 ± 0,04	0,67 ± 0,08	0,68 ± 0,02	0,72 ± 0,5	0,76 ± 0,01	0,87 ± 0,01
C18:2 (9, 12)						
Inoculado	1,82 ± 0,63	2,76 ± 0,07	2,69 ± 0,22	2,8 1 ± 0,1	2,68 ± 0,42	1,97 ± 0,83
Controle	2,57 ± 0,09	2,76 ± 0,06	2,66 ± 0,21	2,50 ± 0,4	2,92 ± 0,40	2,70 ± 0,36

Segundo Molly et al. (1997), a contribuição de bactérias na lipólise em salames fermentados é fraca, porque as condições do meio estão distantes das condições ótimas para as lipases bacterianas. Em salames fermentados inoculados com cultivos iniciadores lipolíticos e não-lipolíticos e um controle contendo glucona-delta-lactona (GDL) e uma mistura antibiótica houve um incremento na concentração total de ácidos graxos livres, mas os resultados não apresentaram diferença significativa entre as amostras, indicando que a lipólise foi em consequência de enzimas endógenas da carne (CHIZZOLINI, NOVELLI & ZANARDI, 1998; MOLLY et al., 1996).

A oxidação lipídica é um complexo fenômeno químico onde a peroxidação é um dos primeiros mecanismos da transformação lipídica (GANDEMER, 2002).

Quando células são injuriadas, como por exemplo, no músculo após a morte do animal, a peroxidação lipídica é favorecida, e traços do radical superóxido ( $O_2^-$ ) e hidroperóxidos ( $H_2O_2$ ) são formados (KANNER, 1994). Um excesso de oxidação lipídica pode atingir ao nível de rancidez e o alimento não seria mais aceito para consumo humano. Também, a oxidação lipídica poderia gerar moléculas tóxicas com possíveis riscos para a saúde humana (GRAY, 1978; ZANARDI et al., 2004).

A determinação de valores de peróxidos é uma estimativa do conteúdo de hidroperóxidos formados no produto. No presente estudo, durante a fermentação/maturação, valores estimados de peróxido e TBARS, aumentaram em ambas as amostras de salames (Tabela 1). Similares valores de peróxido e TBARS foram observados, por Guiretti et al. (1997); Novelli et al. (1998) e Campos et al. (2007), em amostras de salame tipo Milano, com período de maturação entre 30 – 40 dias. Conforme os referidos autores, estes valores correspondem à baixa oxidação lipídica. Após 42 dias de maturação, o salame inoculado apresentou menores valores para peróxidos e TBARS comparado ao salame controle. Estes resultados sugerem que a cultura *L. plantarum* AJ2 produziu bom efeito ( $p < 0,05$ ) na estabilidade oxidativa dos lipídios, mas são necessários estudos para avaliar a oxidação lipídica durante o período de estocagem do salame.

#### **4 Conclusões**

*L. plantarum* AJ2 apresentou boas propriedades tecnológicas como cultivo iniciador em salame, mas estudos adicionais de tais propriedades são importantes, principalmente em relação à estabilidade oxidativa de lipídios durante período de estocagem.

#### **Agradecimento**

Este trabalho teve o apoio da EMBRAPA SUÍNOS e AVES, UFSC e UNIJUÍ.

## Referências

1. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (RJ). *Métodos de análise sensorial de alimentos e bebidas*. NBR 12994. ABNT: Rio de Janeiro, 1993.
2. ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (RJ). *Teste de ordenação em análise sensorial*. NBR 13170. ABNT: Rio de Janeiro, 1994.
3. AMMOR, S. et al. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology*, v. 22, p. 529 – 538, 2005.
4. AMMOR, S. et al. Antibacterial activity of acid lactic bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, v. 17, p. 454 – 461, 2006.
5. ANDRIGUETTO, C.; ZAMPESE, L.; LOMBARDI, A. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meats plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, p. 26 – 30, 2001.
6. AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of AOAC international*. 17. ed., 2002.
7. APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Compendium of methods for microbiological examination of food*. 3. ed. Washington: APHA, 1992.
8. BALEV, D. et al. A comparative study on the effect of some antioxidants on the lipid and pigment oxidation in dry-fermented sausages. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 40, p. 977 – 983, 2005.
9. BRADBERRY, S. M.; GAZZARD, B.; VALE, J. A. Methemoglobinemia caused by the accidental contamination of drinking water with sodium nitrite. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, v. 32, p. 173 – 178, 1994.
10. BRASIL. Ministério da Saúde - MS/Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução Nº 12 de 02 de janeiro de 2001 – Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Available in: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis> > Access on March 06, 2007.

11. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA/ Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 22 de 31 de julho de 2000: Anexo V – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame. Available in: <<http://extranet.agricultura.gov.br/consultasilegis>>. Access on April 14, 2007.
12. Ministério da Saúde - MS. Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS. Portaria Nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: “Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos”, constante do Anexo desta Portaria. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 14 dez., 1998. Seção I, p. 28.
13. BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 12, p. 253 – 272, 1993.
14. CAMMACK, R. et al. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1411, p. 475 – 488, 1999.
15. CAMPOS, R.M.L. et al. Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. *Food Chemistry*, v. 103, p. 1159 – 1167, 2007.
16. CHASCO, J.; LIZASO, G.; BERIAIN, M.J. Cured colour development during sausage processing. *Meat Science*, v. 44, n. 3, p. 203 – 211, 1996.
17. CHEVALLIER, I. et al. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Control*, v. 17, p. 446 - 453, 2006.
18. CHIZZONILIN, R.; NOVELLI, E.; ZANARDI, E. Oxidation in traditional mediterranean meat products. *Meat Science*, v. 49 (suppl. 1), p. S87 – S99, 1998.
19. CORNFORTH, D. P. Role of nitric oxide in treatment of foods. In: Lancaster, J. R. (Ed.). *Nitric oxide: Principles and actions*. San Diego: Academic Press, p. 259 – 287, 1996.
20. CRACKEL, R.L. et al. Some further observations on the the TBA. Test as an index of lipid oxidation in meats. *Food chemistry*, v. 28, p. 187-196, 1988.

21. DELLAGLIO, S.; CASIRAGHI, E.; POMPEI, C. Chemical, Physical and Sensory Attributes for the Characterization of an Italian Dry-cured Sausage. *Meat Science*, v. 42, n. 1, p. 25-35, 1996.
22. DEMEYER, D. HOOZEE, J.; MESDOM, H. Specificity of lipolysis during dray sausage ripening. *Journal Food Science*, v. 39, p. 293 – 296, 1974.
23. DROSINOS, E.H. et al. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*, v. 24, p. 260 - 270, 2007.
24. FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry*, v. 59, n. 3, p. 345 – 353, 1996.
25. FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 497 – 509, 1957.
26. GALGANO, F. et al. Influence of indigenous starter cultures on the free fatty acids content during ripening in artisan sausages produced in the Basilicata region. *Food Technology and Biotechnology*, v. 41, n. 3, p. 253 – 258, 2003.
27. GANDEMER, G. Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, v. 62, p. 309 – 321, 2002.
28. GANDEMER, G. et al. Influence du système d'élevage et du génotype sur la composition chimique et les qualités organoleptiques du muscle long dorsal chez le porc. *Journées Rech. Porc. France*, v. 22, p. 101 – 110, 1999.
29. GEISEN, R.; LÜCKE, F.K.; KRÖCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch*, v. 72, p. 894 - 898, 1992.
30. GRANADILLO, V.A. et al. Three pressurized mineralization procedures that permit subsequent flame atomic spectrometric determination of Ca, Fe, K, Mg and Zn in bovine blood plasma-containing cookies and in standard reference materials. *Analytica Chimica Acta*, v. 306, p. 139 -147, 1995.
31. GRAY, J. I. Measured of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 55, p. 539 – 546, 1978.
32. GRAY J. I. & PEARSON A.M. Cured meat flavor. *Advances in Food Research*. Academic Press, v. 29, p. 1 - 86, 1984.

33. GUIRETTI, G.P. et al. Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano and mortadella production. *Meat Science*, v. 47, n. ½, p. 167 – 176, 1997.
34. HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practies*, v. 22, p. 475 – 481, 1973.
35. HERNÁNDEZ, P.; NAVARRO, J.L.; TOLDRA, F. Lypolitic and oxidative changes in two Spanish pork loin products: dry-cured loin and pickled-cured loin. *Meat Science*, v. 51, p. 123 – 128, 1999.
36. HIERRO, E.; HOZ, L. de la; ORDÓÑEZ, J. A. Contribution of microbial and meat endogenous enzymes to the lipólisis of dry fermented sausages. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 45, p. 2989 – 2995, 1997.
37. HOLLAND, B. et al. *The composition of foods* (5<sup>th</sup> ed., pp. 8-9) London: The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1994.
38. HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of food Microbiology*, v.75, p. 197 – 212, 2002.
39. HUGAS, M. et al. Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of food Microbiology*, v. 18, p. 107 – 113, 1993.
40. HUGAS, K.; MONFORT, J. Ma. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, v. 59, n. 4, p. 547 – 554, 1997.
41. JESSEN, B. Starter cultures for meat fermentation. In: Campbell – Platt; Cook, P. E. *Fermented meats*. London: Blackie Academic Professional, p. 130 – 159, 1995.
42. JOHANSSON, G. et al. Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermentation sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Science*, v. 38, p. 203 – 218, 1994.
43. KENNEALLY, P. M. et al. Lipolytic starter culture effects on production of free fatty acids in fermented sausages. *Journal of Food Science*, 63 (3), 538 – 543, 1998.

44. KENNER, J. Oxidative process in meat and meat products: Quality implications. *Meat Science*, v. 36, p. 169 – 189, 1994.
45. KILLDAY, B.K. et al. Structural characterization of nitrosylhemochromogen of cooked cured meat: implications in the meat-curing reaction. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 36, p. 909 – 914, 1988.
46. LEE, J-Y; KIM, C-J; KUNZ, B. Identification of lactic acid bacteria isolated from *kimch* and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Science*, 72, 437 – 445, 2006.
47. LEROY, F.; VERLUYTEN, J. VUYST, L. D. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 106, p. 270 – 285, 2006.
48. LEROY, F., VUYST, L. D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, p. 67-78, 2004.
49. LÜCKE, F.-K. Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken. *Band 5 der Kulmbacher Reihe*, S, p. 85 – 102, 1985.
50. MAURIELLO, G. et al. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science*, v. 67, p. 149 – 158, 2004.
51. MÖLLER, J.K.S. et al. Microbial formation of nitrite-cured pigment, nitrosylmyoglobin, from metmyoglobin in model systems and smoked fermented sausages by *Lactobacillus fermentum* strains and commercial starter culture. *Eur Food Res Technol*, v. 216, p. 463 – 469, 2003.
52. MOLLY, K. et al. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages: first results of a European project. *Food Chemistry*, v. 59, n. 4, p. 539 – 545, 1996.
53. MONTEL, M.C. et al. Effects of starter cultures on the biochemical characteristics of fresh dry sausage. *Meat Science*, v. 35, p. 229 – 240, 1993.
54. MOTTRAM, D. S. Flavour formation in meat and meat products: a reviews. *Food Chemistry*, 62 (4): 415 – 424, 1998.
55. NOVELLI, E. et al. Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and mortadela. *Meat Science*, v. 48, n. 1/2, p. 29 – 40, 1998.

56. OLESEN, P. T.; MEYER, A. S. STAHNKE, L. Generation of flavour compounds in fermented sausages – the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science*, v. 66, pg. 675 – 687, 2004.
57. OSADA, et al. Cholesterol oxidation in meat products and its regulation by supplementation of sodium nitrite and apple polyphenol before processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 9, p. 3823 – 3829, 2000.
58. PAIK, D. C. et al. Cured meat consumption and hypertension: an analysis from NHANES III (1988 – 94). *Nutrition Research*, v. 25, p. 1049 – 1060, 2005.
59. PAPA, F. et al. Lactic acid bacteria selection for better quality salami. *Industria Alimentari*. V. 32, n. 313, p. 258 - 261, 1993.
60. PAPADIMA, S.N.; BLOUKAS, J.G. Effect of fat level and storage conditions on quality characteristics of traditional Greek sausage. *Meat Science*, v. 51, p. 103 -113, 1999.
61. PAPAMANOLLI, E. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, v. 65, p. 859 – 867, 2003.
62. RANTSIOU, K. et al. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*, v. 22, p. 19 – 28, 2005.
63. SAARELA, M. et al. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1477 – 1482, 2006.
64. SAMELIS, J. et al. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. *Food Microbiology*, v. 11, p. 447 – 460, 1994.
65. SANTOS, E. M. et al. Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology*, v. 39, p. 123 -128, 1998.
66. SANZ, Y. et al. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 37, p. 225 – 229, 1997.

67. SAWITZKI, M.C.; TERRA, N.N. (orientador). Caracterização de bactérias ácido lácticas isoladas de salames artesanais e aplicadas como cultivos iniciadores em salame tipo Italiano. Santa Maria: UFSM, 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, 2000.
68. SAWITZKI, M.C. et al. Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *L. plantarum* isolated from naturally fermented sausages. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 547 – 552. 2007.
69. SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F-K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*, v. 4, p. 199 – 208, 1987.
70. SHAHIDI, E. et al. Effect of sulphanilamide on the TBA values of cured meats. *Journal Food Science*, v. 50, p. 274 – 275, 1985.
71. SMITH, J. L.; PALUMBO, S. A. Use of Starter Cultures in Meats. *Journal of Food Protection*, v. 46, n. 11, p. 997-1006, 1983.
72. SOYER, A.; ERTAS A.H., ÜZÜMCÜOĞLU Ü.; Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). *Meat Science*, v. 69, p. 135 - 141, 2005.
73. TARLADGIS, B. G. et al. Chemistry of the 2 – tiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. *Journal Science Food Agriculture*, v.15, p. 602 – 607, 1964.
74. TORRES, E. A. F. S. et al. Lipid oxidation in charqui (salted and dried beef). *Food Chemistry*, v. 32, p. 257-268, 1989.
75. ZANARDI, E. et al. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*, v. 66, p. 415 – 423, 2004.
76. ZANARDI, E. et al. Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of packing conditions. *Meat Science*. v. 61. p. 7 – 14. 2002.
77. YOUNATHAN, M. T.; WATTS, B.M. Oxidation of tissue lipids in cooked pork. *Food Research*, v. 25, p. 538 – 543, 1960.
78. WIRTH, F. Restricting and dispensing with curing agents in meat products. *Fleischwirtschaft*, v. 71, p. 1051 – 1054, 1991.

79. WIRTH, F. Curing: colour formation and colour retention in frankfurter – type sausage, *Fleischwirtschaft International*, v. 2, p. 3 – 9, 1987.
80. WOODS, L.F.J.; WOODS, J.M.; GIBBS, P.A. Nitrite. in: GOULD, G.W. (Ed.) Mechanisms of action of food preservation procedures. London: *Elsevier Applied Science*, p. 225 – 246, 1990.

## 5 Considerações finais

Há um crescente interesse pelo estudo de microrganismos na área de alimentos em razão das desejáveis propriedades que os mesmos promovem, tanto nas propriedades dos alimentos quanto para a saúde do consumidor. Esses microrganismos podem ser isolados do ambiente natural, identificados e multiplicados em laboratório, visando à sua obtenção em quantidade suficiente para uso comercial, mas, no Brasil, o processo ainda é dependente de culturas importadas para atender à demanda interna. Neste contexto, entende-se que foi significativa a presente pesquisa como domínio da técnica de isolamento de culturas a partir do habitat natural, a caracterização e a obtenção das culturas como cultivos iniciadores.

As culturas de bactérias ácido lácticas isoladas a partir da microbiota natural de salames artesanais e caracterizadas como *L. plantarum* apresentaram propriedades tecnológicas significativas como cultivos iniciadores em produtos cárneos, mas é importante estudos adicionais considerando: a viabilização econômica da produção destas culturas, a investigação da natureza dos compostos que promoveram atividade antagonística em relação a outras culturas, o sinergismo com cocos Gram-positivos, catalase-positivos e as propriedades destas culturas na produção artesanal de salames, visando à produção de alimentos com melhor qualidade organoléptica, seguros e competitivos.

O desenvolvimento desta tese possibilitou: a publicação do artigo SAWITZKI, M. C. et al. Phenotypic characterization and species-specific PCR of promising starter culture strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from naturally fermented sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p. 547 – 552, 2007; o aceite do artigo SAWITZKI, M. C. et al. *L. plantarum* AJ2 isolated from naturally fermented sausages and their effects in the technological properties of the Milano – type salami pela Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos; e o artigo: SAWITZKI, M. C. et al. *L. plantarum* isolated from naturally fermented sausages and studies on their technological properties for application as starter culture, que está sob revisão pela Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.