

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DOS ALIMENTOS**

***STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* E *LACTOCOCCUS  
LACTIS SSP LACTIS* NATIVOS UTILIZADOS NA  
ELABORAÇÃO DE SALAME TIPO ITALIANO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Andréia Cirolini**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2008**

**STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS E LACTOCOCCUS LACTIS  
SSP LACTIS NATIVOS UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DE  
DE SALAME TIPO ITALIANO**

por

**Andréia Cirolini**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), para requisito parcial da obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Leadir Lucy Martins Fries**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2008**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos  
Alimentos**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS E LACTOCOCCUS LACTIS SSP  
LACTIS NATIVOS UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DE SALAME  
TIPO ITALIANO**

elaborada por  
**Andréia Cirolini**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Comissão Examinadora:**

---

**Leadir Lucy Martins Fries, PhD.**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Djalma Dias da Silveira, Dr. (UFSM)**

---

**Ernesto Hashime Kubota, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2008

Dedico este trabalho ao meu pai

Oscar Cirolini *in memoriam*

Norteador do meu caráter e da minha formação

Exemplo de trabalho e honestidade

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS por iluminar o meu caminho!

Agradeço a minha família, em especial minha mãe Célia, pelo apoio, estímulo, carinho, amor... proporcionados durante toda minha vida. Meus irmãos, cunhada e cunhados, sobrinhos e sobrinhas, por me ajudar, me incentivar e torcer para que tudo desse certo sempre. Amo vocês!

Ao Vagner “meu amorzinho” agradeço pelo companheirismo em todos os momentos, ao seu apoio, dedicação e amor.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra Leadir L. M. Fries, agradeço pela orientação, confiança, companheirismo e amizade. Agradeço a oportunidade que me deste.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Nelcindo N. Terra, agradeço pela incansável colaboração na realização deste trabalho e pelo estímulo e pelos valiosos ensinamentos passados.

À Liana Inês Guidolin Milani, pela paciência, companheirismo, amizade, pelos ensinamentos transmitidos.

As minhas colegas, as quais se tornaram grandes amigas, agradeço pelo companheirismo e ajuda na realização deste trabalho, em especial Giovanna, Eliana, Diala, Bibiana, Ana Paula, Vanessa.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade da realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, que colaboraram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida!

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS E LACTOCOCCUS LACTIS SSP LACTIS NATIVOS UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DE SALAME TIPO ITALIANO**

AUTOR: ANDRÉIA CIROLINI

ORIENTADORA: LEADIR LUCY MARTINS FRIES

CO-ORIENTADOR: NELCINDO NASCIMENTO TERRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 25 de fevereiro de 2008.

Este trabalho teve por objetivo produzir e testar o desempenho de culturas *starters* nativas na fabricação de salame tipo Italiano quanto à segurança e qualidade dos salames. No primeiro experimento, cepas de *Staphylococcus xylosus* foram isoladas de salames coloniais, caracterizadas e após identificadas pelo *Kit* Api Staph (Biomérieux). No segundo experimento, o microrganismo *Lactococcus lactis ssp lactis* foi fermentado em meio de cultura de plasma suíno e avaliado sua eficiência em relação ao caldo MRS, através de análises microbiológicas e densidade óptica (DO). No terceiro experimento, as culturas isoladas e multiplicadas foram adicionadas em salame, elaborando-se quatro tratamentos: T1 - adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2 - mistura de *Staphylococcus xylosus* isolado mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3 - mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolado mais *Staphylococcus xylosus* comercial e T4 - *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados, avaliando sua influência nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais. Foram identificadas 13,3% das colônias isoladas de salames coloniais como *Staphylococcus xylosus*. O crescimento máximo de *Lactococcus lactis ssp lactis*, em meio de cultura de plasma suíno, foi de 8,58 Log UFC.mL<sup>-1</sup> no tempo de 27 horas e DO de 0,88. Em caldo MRS, o crescimento atingiu pico máximo (8,70 Log UFC.mL<sup>-1</sup>) em 6 horas, apresentando uma DO de 0,81. Todos os salames elaborados apresentaram uma queda de pH significativa e também uma redução na atividade de água, garantindo uma segurança microbiológica aos produtos. Em relação a oxidação lipídica, os tratamentos que continham cepas de *Staphylococcus xylosus* isolados apresentaram valores significativamente menores que os outros tratamentos. Os salames elaborados com as duas cepas isoladas (T4) apresentaram melhores resultados sensoriais quando comparados com salames elaborados com culturas *starters* comerciais. Portanto, este estudo indicou que seria promissor ampliar a disponibilidade de linhagens para uso industrial proveniente da seleção de culturas nativas, que o meio de cultura de plasma suíno torna-se uma alternativa para a multiplicação de bactérias ácido lácticas, pois apresentou um desempenho semelhante à fermentação do meio de cultura comercial e que a adição de culturas *starters* nativas pode ser utilizada na elaboração de salames, proporcionando produtos seguros e com *flavor* diferenciado.

Palavras-chave: *Staphylococcus xylosus*; *Lactococcus lactis ssp lactis*; plasma suíno; salame tipo Italiano; culturas *starters*.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Pos-Graduate Course of Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **NATIVE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* AND *LACTOCOCCUS LACTIS SSP LACTIS* USED IN THE ELABORATION FERMENTED ITALIAN SAUSAGE**

AUTHOR: ANDREIA CIROLINI  
ADVISER: LEADIR LUCY MARTINS FRIES  
CO-ADVISER: NELCINDO NASCIMENTO TERRA  
Place and Date of Defense: Santa Maria, February 25, 2008.

The objective of this study was to produce and to test the performance of native *starters* cultures in the elaboration of fermented Italian sausage in relation to the security and quality of the sausages. In the first experiment strains of *Staphylococcus xylosus* isolated from colonial sausages, were characterized and after identified for the *Kit Api Staph* (Biomérieux). In the second experiment, the microorganism *Lactococcus lactis ssp lactis* was fermented in pork plasma culture medium and evaluated its efficiency in relation to MRS broth, through microbiological analyses and optic density (OD). In the third experiment the isolated and multiplied cultures were added in dry fermented sausages, elaborating four treatments: T1 - addition of commercial *starters* (*Staphylococcus xylosus* and *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2 - mixture of isolated *Staphylococcus xylosus* more commercial *Lactococcus lactis ssp lactis* ; T3 - mixture of isolated *Lactococcus lactis ssp lactis* more commercial *Staphylococcus xylosus* and T4 - *Staphylococcus xylosus* and *Lactococcus lactis ssp lactis* both isolated, evaluating its influence on the microbiological, physico-chemical and sensorial characteristics. About 13.3% of the colonies isolated of sausages were identified as *Staphylococcus xylosus*. The maximum growth of *Lactococcus lactis ssp lactis*, in pork plasma culture medium was 8.58 Log UFC.mL<sup>-1</sup> in 27 hours, and the OD 0.88. In the MRS broth the growth reached the maximum peak (8.70 Log UFC.mL<sup>-1</sup>) in 6 hours, presenting OD of 0.81. All the elaborated sausages presented a significant decreased of pH and a reduction in the water activity, ensuring a microbiological security to the products. In relation the lipid oxidation, the treatment that contained isolated strains of *Staphylococcus xylosus* presented significantly lower values than the other treatments. The sausages elaborated with both strains isolated presented better sensorial results than the sausages elaborated with commercial *starters* cultures. Therefore, this study indicated that would be promising to extend the availability of microorganisms for industrial use from the selection of native cultures, that the pork plasma culture medium becomes an alternative for the multiplication of lactic acid bacteria, because it presented a similar fermentation performance to the commercial culture medium and that the addition of natives *starters* cultures can be used in the elaboration of fermented Italian sausages, providing safety products and with differentiated flavor.

Keywords: *Staphylococcus xylosus*; *Lactococcus lactis ssp lactis*; pork plasma; fermented Italian sausage; *starters* cultures.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Produto cárneo salame .....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Elaboração do salame .....	11
2.1.2 Ingredientes da formulação do salame .....	12
<b>2.2. Culturas iniciadoras (starters) .....</b>	<b>13</b>
2.2.1. Bactérias ácido lácticas .....	14
2.2.1.1. <i>Lactococcus lactis ssp lactis</i> .....	16
2.2.1.2. Meios de cultura utilizados no cultivo de bactérias ácido lácticas.....	16
2.2.2. Família <i>Micrococcaceae</i> .....	18
2.2.2.1. <i>Staphylococcus xylosus</i> .....	19
<b>3. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 ARTIGO 1 .....</b>	<b>21</b>
<b>ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS DE</b>	
<b>SALAMES COLONIAIS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 ARTIGO 2 .....</b>	<b>36</b>
<b>LACTOCOCCUS LACTIS SSP LACTIS FERMENTADO EM MEIO DE CULTURA</b>	
<b>DE PLASMA SUÍNO .....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 ARTIGO 3 .....</b>	<b>49</b>
<b>SALAME TIPO ITALIANO ELABORADO COM CULTURAS STARTERS NATIVAS</b>	
<b>.....</b>	<b>49</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os procedimentos tradicionais para a preservação da carne são a secagem, salga e fermentação. Este último procedimento caracteriza o salame, um produto cárneo cru, curado, de massa grossa, embutido, fermentado e desidratado o que permite a conservação em temperatura ambiente (TERRA, 2003).

A fabricação do salame iniciou no Brasil com a imigração italiana, no sul do país, região em que o clima é propício para a produção caseira e com o passar do tempo deu origem a pequenas fábricas. As características de estabilidade desses produtos fermentados eram obtidas da fermentação natural da matéria-prima, o que reduzia os valores de pH do produto, impedindo que ocorresse o crescimento de microrganismos deteriorantes (OLIVEIRA, 1999).

De acordo com Vural (1998), em 1957 tivemos a introdução comercial de culturas puras de microrganismos, chamadas culturas *starters*, aos produtos fermentados. A adição dessas culturas específicas permitiu uma uniformidade entre os produtos, redução do tempo de fermentação e uma alta conservação do produto.

Frequentemente as culturas *starters* utilizadas em produtos cárneos são compostas de um microrganismo acidificante, como lactobacilos ou pediococos, que tem a função de estabilizar o produto biologicamente e um microrganismo nitrato-reduzidor, chamados de flavorizantes, ligados à coloração, aroma e sabor. Estes microrganismos nitrato-redutores são comumente micrococcos ou estafilococos coagulase negativa (CARIONI et al., 2001).

Terra (2003) cita que no Brasil, a produção de salames compõe uma fatia significativa do mercado de produtos cárneos, sendo produzidos diariamente cerca de 110 a 120 toneladas. Entretanto, essa produção depende da importação de culturas *starters* e, conseqüentemente, do alto custo de aquisição, além de levar ao esquecimento o sabor e aroma genuinamente brasileiro.

Hammes (1990) destaca que os microrganismos mais promissores para utilização em produtos fermentados são aqueles isolados da microflora indígena de produtos artesanais. Esses microrganismos se adaptam ao ambiente da carne e são capazes de dominar a microflora dos produtos.

Para o isolamento e multiplicação de bactérias ácido lácticas o meio de cultura comumente utilizado em laboratório é o caldo MRS (DE MAN et al., 1960).

Entretanto, estudos estão sendo desenvolvidos na tentativa de reduzir custos utilizando como meio de cultura alternativo o plasma bovino (BARBOZA et al., 1997). De acordo com Del Hoyo et al. (2007) a utilização do sangue seria uma solução para o problema ambiental gerado pelo descarte do excedente no meio ambiente.

Com o objetivo de reduzir o custo de importação aliado ao uso promissor de culturas nativas, buscou-se o isolamento de culturas *starters* e, por sua vez, avaliar o desempenho de tais culturas na fabricação de salame tipo Italiano, quanto à ação destes microrganismos sobre a segurança, modificações físico-químicas e seus reflexos na qualidade sensorial.

Baseado nisto, os objetivos do presente trabalho foram:

- Isolar e caracterizar *Staphylococcus xylosum* de salames artesanais (Artigo 1);
- Fermentar a cepa de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolada de produto lácteo em meio de cultura à base de plasma suíno e avaliar sua eficiência em relação ao crescimento em meio de cultura comercial (Artigo 2);
- Utilizar as culturas de *Staphylococcus xylosum* e *Lactococcus lactis ssp lactis* isoladas, na fabricação de salame tipo Italiano e avaliar as características microbiológicas (bactérias ácido lácticas, *Micrococcaceae*, *Staphylococcus xylosum*, coliformes totais e fecais, *Salmonella sp*, *Staphylococcus* coagulase positiva) e físico-químicas (pH, Aa, perda de peso, TBARS, nitrito, cor) (Artigo 3);
- Analisar sensorialmente o salame através do sabor, odor, cor e textura para verificar seu desempenho frente às culturas comerciais (Artigo 3).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Produto cárneo salame

De acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2000), o salame é um 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. É preparado com a mistura de carnes moídas, com variações quanto à composição e adição de condimentos e aditivos responsáveis pelas variações de salames produzidos no país. Diferencia-se dos demais embutidos pelo baixo teor de umidade e pela presença de ácido láctico, que confere sabor característico (SCHEID et al., 2003).

A fabricação do salame ocorre em duas fases: na primeira, há a fermentação com a ocorrência simultânea de acidificação e formação da cor durante sete dias; a segunda fase, a maturação a qual consiste na desidratação como decorrência da fermentação. No final do processo, o salame apresenta pH 5,2 – 5,4 e atividade de água de 0,87. Ambas as fases acima ocorrem em câmara de maturação dotada de controles de temperatura, umidade relativa e velocidade do ar (FERNÁNDEZ et al., 2000).

#### 2.1.1 Elaboração do salame

O salame é elaborado com uma mistura de carne suína, bovina e toucinho, além disso, sal, nitrato e/ou nitrito, ascorbato, açúcar, temperos e outros (BUCKENHÜSKES, 1993). Após a moagem, a carne é misturada com os demais ingredientes e é embutida em tripas de diâmetro variável (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Após o embutimento, o produto é levado à câmara de maturação, onde a temperatura inicial da câmara deve ser relativamente elevada (>20°C), baixando

depois para 18-20°C, com umidade relativa de 95%, devendo ser reduzida gradativamente durante 3 - 4 dias para 85% (GALLI, 1993).

A fermentação é considerada a etapa mais importante do processamento do salame. Durante a fermentação, ocorrem produção de ácido láctico e conseqüentemente abaixamento do pH do produto, influenciando diretamente sobre o sabor do produto final e contribuindo também para o desenvolvimento da textura e conservação do produto (COELHO et al., 2000). Também acontece nesta etapa por ação das bactérias da família *Micrococcaceae*, a redução do nitrato a nitrito, e este a óxido nítrico, o qual reage com a mioglobina formando a mioglobina nitrosa, pigmento vermelho característico dos produtos curados fermentados (TERRA, 2003).

Na etapa de maturação, se desenvolve a textura do produto, através da perda de peso e também acontecem numerosas reações enzimáticas catalisadas tanto por enzimas tissulares como microbianas, originando substâncias que contribuem para o sabor e aroma do produto final (RÖDEL & STIEBING, 1998).

### 2.1.2 Ingredientes da formulação do salame

O sal serve como condimento e ingrediente funcional, permitindo a solubilização das proteínas miofibrilares e contribuindo para a redução da atividade de água do produto (YAMADA, 1995).

O nitrito contribue para a formação da cor do produto, por meio de reação complexa com as mioglobinas das carnes, para a formação do sabor típico do salame e para a sua conservação, por ter ação bacteriostática (YAMADA, 1995). O nitrito é capaz de inibir o desenvolvimento de algumas bactérias patogênicas, entre as quais se destacam as do gênero *Clostridium*, além de reduzir a ocorrência de rancidez da fração lipídica dos produtos (MÜLLER, 1991).

O ascorbato reage com nitrito reduzindo a óxido nítrico, realçando a formação da cor (ZENI, 2007). Possui ação bloqueadora do desenvolvimento de nitrosaminas e influência no sabor e aroma dos produtos cárneos curados. Também tem como

função inibir processos autooxidativos que levam a rancidez (ORDÓNEZ et al., 2005).

Os temperos contribuem para o sabor e aromas típicos dos embutidos fermentados, possuem efeitos antioxidantes, possivelmente devido à capacidade de quelar metais e também efeitos antimicrobianos (AGUIRREZÁBAL et al., 2000).

Os açúcares contribuem para melhorar o aroma e como substrato para microrganismos presentes na carne ou pelas culturas adicionadas (ORDÓNEZ et al., 1998). Geralmente a formulação de embutidos fermentados contém um açúcar rapidamente fermentável, como por exemplo, a glicose, aliado a um açúcar de fermentação lenta, como a sacarose. A variedade e a quantidade de carboidratos adicionados são importantes, pois determinam a velocidade da multiplicação das bactérias ácido lácticas, quanto maior o peso molecular, menor será a velocidade da fermentação (LÜCKE, 1998).

## **2.2. Culturas iniciadoras (*starters*)**

Inicialmente a fermentação era o resultado da ação dos microrganismos contaminantes existentes na formulação sobre os açúcares, hoje há utilização de culturas puras. O uso de culturas *starters* torna-se essencial para garantir a segurança do alimento, para refinar o sabor, aroma e textura e também reduzir o tempo de processamento e conseqüente redução do custo (TERRA, 2003; IACUMIN et al., 2006).

As culturas *starter* atualmente comercializadas são geralmente compostas de mais de um microrganismo, visando somar suas ações para se obter o efeito desejado no produto final. Os microrganismos mais utilizados são as bactérias ácido lácticas incluindo os gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* em combinação com a família *Micrococcaceae* incluindo os gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*. Enquanto as bactérias ácido lácticas promovem a segurança do produto por redução do pH através da fermentação, *Staphylococcus* coagulase negativa desenvolvem o aroma, *flavour* e a cor (SIMONOVÁ et al., 2006).

Em determinados embutidos fermentados, se utiliza bolores na superfície do produto, os quais atuam sobre o sabor dos salames devido ao seu arsenal enzimático. Também desempenham ação regulando a desidratação e dificultando a penetração do oxigênio na peça, conseqüentemente evitando a ocorrência dos indesejáveis processos oxidativos (TERRA, 2003).

As culturas de bactérias estão disponíveis comercialmente na forma liofilizada, em envelopes, geralmente misturados com lactose em pó. Podem também se apresentar na forma congelada. A cultura liofilizada deve ser diluída utilizando-se água ou água peptonada a 1% (pH 6,8), isenta de cloro. A diluição deve ser feita 30 minutos antes da adição à massa (NASSU, 1999).

De acordo com Terra (2003), para que uma cultura *starter* promova alterações desejáveis, é preciso que ela seja adicionada à massa cárnea em uma quantidade superior, em dois ciclos logarítmicos, à contagem inicial de microrganismos presentes na matéria-prima.

Em relação à segurança alimentar a utilização de culturas iniciadoras proporciona o controle de microrganismos patogênicos devido à competição e ao alto crescimento da flora desejada, além da formação de metabólitos por estas cepas, que também, apresentam atividades antioxidantes e antimicrobianas e, conseqüentemente, atuam para garantir qualidade e segurança microbiológica do produto fermentado (ANTONI, 1998; DROSINOS et al., 2005).

### 2.2.1. Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas são em geral mesófilicas, mas podem crescer em temperaturas abaixo de 5°C ou acima de 45°C. Similarmente, enquanto a maioria das cepas cresce numa faixa de pH entre 4,0 e 4,5, algumas são ativas em pH abaixo de 3,2 e outras em pH acima de 9,6. São geralmente pouco proteolíticas e lipolíticas elas influenciam a proteólise e lipólise principalmente via decréscimo de pH, auxiliando a liberação de enzimas endógenas da carne (CAPLICE & FITZGERALD, 1999).

Este grupo é composto por vários gêneros de bactérias gram-positivas, incluindo *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Obtêm sua energia a partir da fosforilação de substratos durante a oxidação de carboidratos, sendo o seu metabolismo estritamente fermentativo (ROSS et al., 2002; JAY, 2005).

Os membros das bactérias acidoláticas podem ser subdivididos em dois grupos: as homofermentativas, aquelas que produzem ácido láctico como produto principal ou único da fermentação da glicose e heterofermentativas, aquelas que produzem ácido acético, etanol, dióxido de carbono além de ácido láctico (JAY, 1994).

A principal função das bactérias lácticas na fermentação de carnes é a rápida produção de ácido láctico, o que provoca a redução do pH inibindo a ação de microrganismos patogênicos e aumentando a vida-de-prateleira do produto processado; outras funções destas bactérias são as produções de *flavor* diferenciado e a desnaturação das proteínas. Alguns autores têm demonstrado que a produção de ácido láctico e conseqüente queda do pH é o fator mais importante na inibição do crescimento de *Clostridium botulinum* em embutidos fermentados (BUCKENHUSKES, 1993; CARIONI et al., 2001).

Como acrescenta Balduino *et al.* (1999) as bactérias ácido lácticas produzem ácido láctico logo no início da fermentação, o que diminui o valor de pH que pode inibir microrganismos indesejáveis como *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolítica*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Campylobacter jejuni*, além de conferir o sabor ácido característico de produtos fermentados.

Além do ácido láctico, as bactérias ácido lácticas produzem outros produtos metabólitos dotados de ação antibacteriana, como, água oxigenada, diacetil, gás carbônico, reuterina, bacteriocinas e antibióticos (TERRA, 2003).

Greco *et al.* (2005) destacam que o mais conveniente para o uso como culturas *starters* de bactérias ácido lácticas em produtos fermentados são os microrganismos que provem de seu habitat natural. As bactérias ácido lácticas nativas são mais bem adaptadas ao ambiente da carne, é assim com grande importância na tentativa de proteger e padronizar os salames.

### 2.2.1.1. *Lactococcus lactis ssp lactis*

O gênero *Lactococcus* são Gram positivos, não esporulados e não móveis. Tem células esféricas ou ovóides e ocorrem em pares ou cadeias curtas. Possuem requerimento de oxigênio facultativo e metabolismo homofermentativo, fermentam glicose produzindo principalmente ácido láctico. São catalase negativa e oxidase negativa, com temperatura ótima de crescimento de 30°C. Podem crescer a 10°C e não crescem em caldo com pH ajustado a 9,6 ou em caldo contendo 6,5% de NaCl (HOLT et al., 1994). *Lactococcus lactis* é caracterizada pela capacidade de produzir ácido a partir de ribose, e sua incapacidade de produzir ácido de rafinose, ramnose e sorbitol (MUNDT, 1986).

O gênero *Lactococcus lactis ssp. lactis* tem grande importância na indústria de alimentos devido a bacteriocina produzida a nisina, que atua contra bactérias gram positivas e é usada com grande sucesso contra patógenos tais como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* (TOLONEN et al., 2004).

Algumas bacteriocinas têm sido isoladas devido ao interesse como um preservativo natural para alimentos, de acordo com Noonpakdee et al. (2003) a bacteriocina nisina é usualmente isolada de produtos lácteos e vegetais, sendo muito pouco isolada de produtos cárneos. Entretanto o isolamento de cepas de *lactococcus* produtores de nisina de salames potencializou seu uso no sistema de fermentação. Mais recentemente, o uso de *lactococcus* bacteriogênicos em salame tem sido desenvolvido com sucesso.

Cenci-Goga et al. (2007) selecionaram cepas de *Lactococcus lactis ssp lactis* e *Lactococcus casei ssp casei* de queijos de Umbria, Itália, para produção de salames (Salame Nostrano), as culturas selecionadas garantiram produtos seguros e aumentaram a aceitabilidade dos salames.

### 2.2.1.2. Meios de cultura utilizados no cultivo de bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas são microrganismos que necessitam de um meio de cultura rico em aminoácidos pré-formados, peptídeos, derivados de ácidos nucléicos, sais, bases purínicas, pirimídicas e vitaminas (CAPLICE & FITZGERALD, 1999).

De acordo com De Man et al. (1960), o meio de cultura comumente utilizado em laboratório para o isolamento e multiplicação de bactérias ácido lácticas é o caldo MRS. Isso se deve a complexa fonte de nitrogênio (peptonas, extrato de carne e levedura) que possui. Mas devido às fontes complexas de nitrogênio que possui o MRS torna-se de alto custo à aplicação em escala industrial (LAITILA et al., 2004; HYUN & SHIN, 1998).

Entretanto, vários estudos estão sendo desenvolvidos na tentativa de reduzir o custo para a produção desses microrganismos. Barboza et al. (1997) utilizaram com meio de cultura alternativo ao caldo MRS o plasma bovino como fonte de nitrogênio, e concluíram que o crescimento das bactérias ácido lácticas no meio de cultura produzido foi similar ao crescimento em caldo MRS, além de redução no custo de produção.

De acordo com Del Hoyo et al. (2007) entre os sub-produtos da indústria cárnea o sangue é o mais problemático devido a larga quantidade produzida e capacidade poluente. Nos EUA estima-se que 1,6 milhões de toneladas são desperdiçados anualmente. A utilização do sangue seria uma solução para o problema ambiental gerado pelo descarte do excedente no meio ambiente.

O sangue suíno tem composição semelhante ao sangue bovino, possuindo grande quantidade de proteínas e aminoácidos essenciais (MÁRQUEZ et al., 2005).

As proteínas do sangue são adicionadas como agente emulsificantes, estabilizantes, clarificantes, componentes nutritivos e como suplemento de lisina. (HYUN & SHIN, 1998). O sangue possui proteínas com propriedades funcionais que são comparadas à albumina do ovo (DEL HOYO et al., 2007).

A maioria das proteínas do sangue são encontradas no plasma, com exceção da hemoglobina, o plasma é formado basicamente de 7% de proteína e 91% de água (MOURE et al., 2003).

Também Hyun & Shin, (1998) desenvolveram um trabalho utilizando um hidrolizado enzimático de plasma bovino em substituição ao caldo MRS. Eles observaram que o meio de cultura produzido apresentou crescimento de bactérias

ácido lácticas significativamente alto, correspondendo a aproximadamente 74% do crescimento obtido no caldo MRS.

### 2.2.2. Família *Micrococcaceae*

A família *Micrococacceae* inclui os gêneros *Micrococcus* spp. formado por bactérias aeróbias e *Staphylococcus* spp. formado por bactérias facultativas, que se desenvolvem mais rapidamente em condições aeróbicas. São catalase positivas, nitrato redutoras, não são produtoras de ácido láctico. Desenvolvem o aroma e o sabor característicos através de suas enzimas proteolíticas e lipolíticas. (NASSU, 1999; PINTO et al., 2001).

*Micrococcaceae* participam do desenvolvimento e estabilização da cor pela atividade nitrato redutase, que leva a formação da mioglobina nitrosa. Além disso, a redução de nitrato produz nitrito que pode limitar a oxidação lipídica, também há formação do aroma devido ao fato de possuírem enzimas proteolíticas e lipolíticas que, ao agirem sobre proteínas e lipídeos, geram peptídeos, aminoácidos e ácidos graxos (MAURIELLO et al., 2004; SIMONOVÁ et al., 2006; IACUMIN, et al., 2006).

Também pela capacidade de nitrato redutase que a família *Micrococcaceae* apresenta diminuem a possibilidade de formação de nitrosaminas, compostos de ação carcinogênica, através da redução dos níveis de nitrito residual (HAMMES & KNAUF, 1994).

Cocolin et al. (2001), destacam que determinadas cepas de *Micrococcaceae* tem sido selecionadas e usadas como culturas para garantir o *flavor*, padronizar os produtos e reduzir o tempo de maturação. Estudos da composição microbial de salames mostram que *Staphylococcus* superam *Micrococcus* durante a fermentação, entretanto, ambos têm um papel na fermentação do salame de contribuir para a estabilidade da cor, reduzir nitrato em nitrito e quebra de triglicerídeos e proteínas. E como acrescenta Coppola et al. (1997), são também considerados responsáveis pelo aumento do pH.

Drosinos et al. (2005) investigaram a evolução de diferentes categorias de microrganismos de fermentação natural de produtos cárneos, identificando e

caracterizando os grupos desejáveis (bactérias ácido lácticas e gram-positivas, catalase positivas), selecionando as mais resistentes com propriedades tecnológicas e atividade antimicrobiana contra patógenos para ser usado como cultura protetora. As espécies de microorganismos predominantes foram *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus simulans*.

#### 2.2.2.1. *Staphylococcus xylosus*

Conforme cita Iacumin et al. (2006), o *Staphylococcus xylosus*, é o mais importante membro da família *Micrococcaceae* no campo da microbiologia alimentar. É a espécie mais numerosa presente durante a fermentação de salames, sendo também o microrganismo mais frequentemente isolado de espécies de *Staphylococcus*.

Geisen et al. (1992) e Lucke (1994), destacam que as atividades metabólicas desejáveis desenvolvidas pelo *Staphylococcus xylosus* nos produtos fermentados são a produção de catalase, nitrato redutase e a redução do oxigênio na superfície do produto, contribuindo assim para a liberação das enzimas proteases e lipases que auxiliam no desenvolvimento do aroma e sabor.

A temperatura ótima de crescimento para o *Staphylococcus xylosus* é em torno de 30°C, tolerando alta concentração de sal (15% em água) e nitrito até 200ppm, não se desenvolvendo bem em pH ácido (abaixo de 5,7) (STAHNKE, 1995).

Fiorentini et al. (2006) isolaram linhagens de *Staphylococcus xylosus* de embutidos cárneos artesanais comercializados na região Noroeste do RS. Todas as linhagens selecionadas apresentaram atividade catalase, crescimento a temperatura de 15 e 45°C e pH 5,0 e 5,5, tolerância a NaCl e NaNO<sub>2</sub> e capacidade de reduzir nitrito em meio líquido, demonstrando potencial para aplicação como cultivos iniciadores em produtos cárneos fermentados.

Um esquema proposto por Kloos and Schleifer (1975) e modificado por Bannerman (2003) é um método de referência usado para identificação de *Staphylococcus*, entretanto, este método exige um grande número de testes

bioquímicos. Cunha et al. (2004) realizaram um estudo para comparar quatro métodos, o método de referência, o sistema API Staph (bioMérieux) e dois métodos modificados do método de referência (método simplificado e método disco), na identificação de 100 cepas. *Staphylococcus xylosus* foi corretamente identificado pelos quatro métodos. Sendo que o método simplificado mostrou-se eficiente em todas as cepas identificadas, com 100% de sensibilidade e especificidade e promovendo uma alternativa para identificação de *Staphylococcus* de alta confiabilidade e de baixo custo.

Vilani et al. (1997) descreveram em seu estudo a atividade inibitória das substâncias produzidas por *Staphylococcus xylosus* 1E contra *Listeria monocytogenes* e outras bactérias Gram-positivas. Simonová et al. (2006) acrescenta que a inibição de *Listeria monocytogenes* por bacteriocinas produzidas por *Staphylococcus* aumenta a prevenção contra patógenos em salames.

A segurança desses produtos também depende do conteúdo de aminas biogênicas, tais como histamina, tiramina, feniletilamina, e triptamina. Os quais podem ocorrer em altas concentrações em produtos fermentados obtidos a partir de matérias primas compostas por proteínas. São consideradas indesejáveis por apresentarem efeitos tóxicos aos seres humanos quando consumidas em altas concentrações (MARTUSCELLI et al., 2000). Como cita Gardini et al. (2002), não somente a presença de aminoácidos livres e atividade descarboxilase são importantes para a produção de aminas biogênicas, mas também fatores como atividade de água e a interação entre diferentes grupos de microrganismos.

Em um estudo realizado por Simonová et al. (2006) isolaram e caracterizaram a população de *Staphylococcus* coagulase negativa em diferentes tipos de salame da Slovakia, sendo que as cepas de *Staphylococcus xylosus* identificadas passaram por um teste de amino ácido-descarboxilase, o qual não foi encontrado nenhum tipo de amina biogênica.

### 3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

#### 3.1 ARTIGO 1

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS* *XYLOSUS* DE SALAMES COLONIAIS<sup>1</sup>

**Andréia Cirolini<sup>2</sup>, Leadir Lucy Martins Fries<sup>3\*</sup>, Nelcindo  
Nascimento Terra<sup>3</sup>, Liana Inês Guidolin Milani<sup>4</sup>, Diala Urnau<sup>2</sup>,  
Bibiana Alves dos Santos<sup>5</sup>, Giovanna Dotta Cervo<sup>5</sup>, Ana Paula de  
Souza Rezer<sup>4</sup>**

Em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.

---

<sup>1</sup> Manuscrito recebido em

<sup>2</sup> Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCR, UFSM.

<sup>3</sup> Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. \*E-mail: [lucymicro@yahoo.com.br](mailto:lucymicro@yahoo.com.br).

<sup>4</sup> Técnica de Laboratório de Microbiologia, CCR, UFSM.

<sup>5</sup> Graduação em Farmácia e Bioquímica, CSS, UFSM.

\*A quem a correspondência deve ser enviada.

## RESUMO

A família *Micrococcaceae* inclui os gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*, os quais apresentam papel fundamental no desenvolvimento e estabilização da cor pela atividade nitrato redutase, além de limitar a oxidação lipídica. Também são responsáveis pela formação do *flavor* pela atividade lipolítica e proteolítica que possuem. O *Staphylococcus xylosus* é predominantemente a espécie mais isolada de produtos cárneos fermentados. A pesquisa teve como objetivo isolar e caracterizar cepas de *Staphylococcus xylosus* de salames coloniais. As linhagens foram coletadas de 3 amostras de salames coloniais comercializadas na região central do RS. As culturas foram selecionadas em meio ágar Baird Parker e incubadas a 36°C por 48h. Foram isoladas 5 colônias de cada amostra para posterior caracterização através de coloração de Gram, teste de coagulase, catalase, crescimento a concentração de 10% e 15% de NaCl em ágar nutriente e crescimento à temperatura de 15°C e 45°C em caldo BHI (Brain Heart Infusion). Para identificação do microrganismo foi aplicado o *kit* Api Staph (Biomérieux). Através das análises realizadas, as cepas apresentaram características típicas do *Staphylococcus xylosus* como Gram positivo, coagulase negativo e catalase positivo, crescimento sob as diferentes concentrações de NaCl e crescimento a temperatura de 15°C e 45°C, sendo selecionadas para posterior identificação no *kit* Api Staph. Decorrido o tempo de 24h à 35°C - 37°C, efetuou-se a leitura e interpretação dos resultados, onde das 15 cepas isoladas, 13,3% das colônias foram identificadas como *Staphylococcus xylosus*.

Palavras chaves: *Staphylococcus xylosus*, culturas *starters*, salames coloniais

## ABSTRACT

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* OF ARTISANAL FERMENTED SAUSAGES

The *Micrococcaceae* family includes the *Micrococcus* and *Staphylococcus*, which have important role in the development and stabilization of the color by the nitrate reductase activity, besides limiting the lipid oxidation. Also they are responsible for the flavor formation by the lipase and protease activities. The *Staphylococcus xylosus* is predominantly more isolated specie of fermented products. The objective of this research was to isolated and characterized strains of *Staphylococcus xylosus* from artisanal fermented sausages. The strains had been collected from 3 samples of

commercialized artisanal fermented sausages in the central region of the RS. The cultures were selected in BAIRD PARKER agar at 36°C for 48h. For future characterization 5 isolated colonies of each sample were analysed through Gram stain, coagulase and catalase test, growth at 10% and 15% of NaCl concentration in nutrient agar and the growth in broth BHI (Brain Heart Infusion) at the temperatures of 15°C and 45°C. For identification of the microorganisms the *kit* Api Staph was used (Biomérieux). The results showed strains with typical characteristics of the *Staphylococcus xylosus*, as positive Gram, negative coagulase and positive catalase, growth under the different concentrations of NaCl and growth the temperature of 15°C and 45°C, which were selected for posterior identification in the *kit* Api Staph. After the incubation time (24 h) in the Api Staph kit at 35°C - 37°C the reading and interpretation of the results were done, where 13.3% of colonies were identified as *Staphylococcus xylosus*.

Keywords: *Staphylococcus xylosus*, isolation, artisanal fermented sausages

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de culturas *starters* para a produção de produtos fermentados está tornando-se cada vez mais necessário para garantir a segurança, uniformidade entre os produtos. As culturas *starters* frequentemente utilizadas em produtos cárneos são as bactérias ácido lácticas que tem a função de estabilizar o produto biologicamente e *Staphylococcus* coagulase negativa como o *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus* que promovem o flavor dos produtos fermentados (ESSID et al., 2007).

*Staphylococcus* coagulase negativa tem importante papel no desenvolvimento e estabilidade da cor vermelha pela atividade nitrato redutase, além de limitar a oxidação lipídica. Também pela atividade lipolítica e proteolítica produzem várias substâncias aromáticas e ácidos orgânicos que tem considerável papel no desenvolvimento do flavor (SIMONOVÁ et al., 2006; TALON et al., 1999).

As bactérias mais promissoras para serem utilizadas como culturas *starters* são aquelas isoladas da microflora nativa de produtos artesanais. Esses

microrganismos se adaptam ao ambiente da carne e são capazes de dominar a microflora dos produtos (HAMMES,1990).

Como destaca Campagnol (2007), com a importação integral das culturas *starters* utilizadas, a partir da Dinamarca, França e Alemanha, além de contribuir para um desequilíbrio da balança comercial, leva a um esquecimento do sabor brasileiro.

Assim, a seleção de cepas a partir de salames artesanais fabricados em nosso país seria uma alternativa para o produto manter sua característica artesanal com controle da fermentação e estável a temperatura ambiente além de um *flavor* característico e diferenciado.

Portanto, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar cepas de *Staphylococcus xylosus* de salames coloniais da região central do Rio Grande do Sul - Brasil.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Amostra**

As cepas de *Staphylococcus* foram isoladas a partir de salames coloniais, adquiridos no comércio da cidade de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul de 3 diferentes origens de produção. As amostras encontravam-se em estágios de maturação distintos e foram mantidas em condições ambientais, sem controle de temperatura, ventilação e umidade.

#### **2.1.1 Preparo da amostra**

Para o preparo da amostra, coletou-se assepticamente 25g, de cada amostra, as quais foram adicionadas 225 mL de água peptonada etérl 0,1%, obtendo-se a primeira diluição 1:10 e homogeneizadas em *stomacher* por 2 minutos. Realizaram-

se diluições decimais subseqüentes,  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ , e procedeu-se a semeadura em superfície utilizando-se Ágar Baird Parker, com incubação a 36°C por 48 horas (BRASIL, 2003).

## **2.2 Obtenção de culturas puras**

Transcorrido o período de incubação, selecionou-se aleatoriamente 5 colônias de cada amostra. Para cada cepa foi realizada a semeadura por esgotamento em estria, em placa contendo Ágar Baird Parker a fim de obter uma cultura pura. Após a incubação à 36°C por 48 horas, transferiu-se uma colônia de cada placa para o caldo BHI (BRASIL, 2003).

Obteve-se um total de 15 cepas isoladas. Conforme ZUBER & HORVAT (2007) as cepas foram conservadas congeladas à -25°C em caldo BHI (Brain Heart Infusion) com 7,5% de solução de lactose como crioprotetor, para posteriores testes de identificação.

## **2.3 Caracterização das cepas de *Staphylococcus* isoladas**

### **2.3.1 Coloração de Gram**

As cepas de *Staphylococcus* foram submetidas à coloração de Gram pelo método tradicional, a partir de um esfregaço fino, obtido de uma pequena porção de cultura, emulsionado em uma gota de água destilada e secado próximo à chama do bico de Bunsen (BRASIL, 2003).

### **2.3.2 Produção de coagulase**

Para o teste de coagulase transferiu-se 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI (Brain Heart Infusion) para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho e incubou-se a 36°C, por 6 horas. A não formação de coágulo foi indicativa de prova negativa (BRASIL, 2003).

### 2.3.3 Produção de catalase

O teste de produção de catalase foi realizado misturando com auxílio de alça de platina, uma alíquota do cultivo em uma lâmina contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. A produção de borbulhas indica prova positiva para catalase (BRASIL, 2003).

### 2.3.4 Desenvolvimento em diferentes temperaturas

Foram adicionados 0,1 mL da cultura testada em 3,0 mL de caldo BHI e incubados a 15°C e 45°C, por 14 dias. A presença de sedimento no meio de cultura é indicativo de que o microrganismo desenvolveu-se nas referidas temperaturas (HOLT et al., 1994).

### 2.3.5 Tolerância de sal

Foram adicionados 0,1 mL da cultura teste em ágar nutriente suplementado com 10% e 15% de NaCl por 24 horas (COPPOLA et al., 1997). O crescimento no meio de cultura é indicativo de que o microrganismo desenvolveu-se nas referidas concentrações salinas.

## **2.4 Identificação das cepas de *Staphylococcus***

A partir dos testes citados, as espécies de *Staphylococcus* foram identificadas utilizando o *kit* API STAPH e APIWEB em concordância com os procedimentos do fabricante (Biomérieux, France) (HARRIGAN, 1998).

Contou-se com a colaboração da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” de Campinas/SP para fins de comprovação quanto à identidade da cepa selecionada.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização das cepas de *Staphylococcus* selecionadas a partir de salames artesanais

Pode-se observar na Tabela 1 que as 15 cepas selecionadas a partir de salames coloniais apresentaram características Gram positivos, coagulase negativa e catalase positiva. Também apresentaram crescimento à temperatura de 15°C e 45°C e desenvolvimento nas concentrações 10% e 15% de NaCl.

Tabela 1. Caracterização de 15 cepas de *Staphylococcus* selecionadas a partir de salames artesanais

<b>Característica</b>	<b><i>Staphylococcus</i></b>
Coloração de Gram	Positiva
Coagulase	Negativa
Catalase	Positiva
Crescimento a 15°C e 45°C	Positiva
Crescimento a 10% e 15% de NaCl	Positiva

Coppola et al. (1997), selecionaram 80 cepas de *Staphylococcus* de salames do sul da Itália, onde 99% destes foram coagulase negativa. Entre os

*Staphylococcus* coagulase negativa isolados, 60 cepas foram identificados como *Staphylococcus xylosus*.

Papamanoli et al. (2002), caracterizando *Micrococcaceae* isolados de salames, testaram o crescimento na concentração de sal de 10% e 15% em P-ágar e verificaram que a maioria das cepas de *Staphylococcus xylosus* e 50% de *Staphylococcus carnosus* se desenvolveram em alta concentração de sal.

Dados do trabalho de Coppola et al. (1997), testando a capacidade de 58 *Micrococcus* e 73 *Staphylococcus* de crescer com 10% ou 15% de NaCl, demonstrou que 100% das cepas foram capazes de crescer a 10% de NaCl e 70% de *Micrococcus* e 92% de *Staphylococcus* cresceram a 15% de NaCl.

Em um estudo realizado por Essid et al. (2007), testando a habilidade de o *Staphylococcus xylosus* crescer a temperatura de 10, 15 e 20°C em caldo TSB e também suplementado com 10%, 15% e 20% de NaCl, concluíram que todas as cepas cresceram a 10 e 20°C, temperatura usualmente usada na fermentação da carne, e na presença de 10%, 15% e 20% de sal.

A interação entre sal e temperatura foi negativa para todas as cepas de *S. xylosus*, *S. lentus* e uma cepa de *S. equorum*, em um estudo realizado por Sondergaard & Stahnke (2002), onde concentrações elevadas de sal tiveram um impacto negativo maior em altas temperaturas do que em temperaturas mais baixas. Essa interação também é mostrada por Sorensen & Jakobsen (1996), onde aumentando a concentração de sal, decresce o crescimento dos microrganismos, principalmente em alta temperatura e alto pH. Estes autores concluíram que as condições em que são fermentados os salames, em geral, não favorecem o crescimento do *Staphylococcus xylosus*.

### 3.2 Identificação das cepas de *Staphylococcus*

As cepas, após caracterização morfológica, foram posteriormente identificadas pelo *kit* Api Staph (Biomérieux, France).

Este sistema de identificação é considerado um método rápido e prático, que comporta 20 testes bioquímicos. Após a incubação de 18-24 horas a 35-37°C, as

reações são interpretadas e os microrganismos identificados usando um catálogo analítico ou um programa de identificação (CUNHA et al., 2004).

Um esquema proposto por Kloos and Schleifer (1975) e modificado por Bannerman em 2003 é um método de referência usado para identificação de *Staphylococcus*. Entretanto, este método exige um grande número de testes bioquímicos e necessita um maior período de incubação (24 a 72 horas), tornando-se de pouca aplicabilidade na rotina dos laboratórios de microbiologia (SILVA et al.; 2006).

Cunha et al. (2004) realizaram um estudo para comparar quatro métodos de identificação: o método de referência Kloos and Schleifer modificado por Bannerman, o sistema API STAPH (Biomérieux) e dois métodos modificados do método de referência (método simplificado e método disco). *Staphylococcus xylosus* foi corretamente identificado pelos quatro métodos. O *kit* API STAPH mesmo não sendo efetivo para algumas cepas como *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, para *Staphylococcus xylosus* apresentou 100% de sensibilidade e especificidade.

A identificação das cepas de *Staphylococcus* através do *kit* Api Staph encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2:** Identificação das cepas de *Staphylococcus* pelo sistema API STAPH (Biomérieux, France).

Espécie	N° de microrganismos isolados	% de microrganismos isolados
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	12	80
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	13,33
<i>Staphylococcus cohnii ssp urealyticus</i>	1	6,67
Total	15	100

Conforme dados expostos, o *Staphylococcus saprophyticus* foi a espécie isolada mais predominante (80%), seguido pelo *Staphylococcus xylosus* (13,33%) e *Staphylococcus cohnii ssp urealyticus* (6,67%).

Resultados semelhantes foram obtidos por Drosinos et al. (2005), onde *Staphylococcus saprophyticus* foi a espécie dominante (31,1%), seguido por *Staphylococcus xylosus* (19,2%) e *Staphylococcus simulans* (11,4%). Samelis et al. (1998) também encontraram em 4 amostras de salames tradicionais Gregos a predominância de *Staphylococcus saprophyticus*, seguido por *Staphylococcus xylosus*. Resultados similares foram reportados por Papamanoli et al. (2002), onde a maioria das cepas foram identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* (22%), *Staphylococcus carnosus* (20%) e *Staphylococcus xylosus* (10%).

De acordo com Drosinos et al. (2005), as cepas de *Staphylococcus saprophyticus* são oriundas da pele de suínos ou devido à manipulação durante a elaboração do salame, já que esta espécie é prevalentemente encontrada na pele humana e ocasionalmente na pele de animais domésticos.

Samelis et al. (1998) reporta que o *Staphylococcus saprophyticus* deveria ser uma espécie avaliada com potencial para uso como cultura *starter*, mas conforme Hammes & Hertel (1998) esta espécie é reconhecida como um patógeno oportunista e que necessita cuidado. Em um trabalho realizado por Mauriello et al. (2004), apenas 2 cepas da espécie apresentam atividade nitrato redutase, a qual seria o primeiro critério para seleção de cepas como culturas *starters* em salames. Entretanto, apresentam altos valores de atividade superóxido dismutase e atividade catalase e que podem prevenir a oxidação lipídica durante a maturação do salame.

Embora *Staphylococcus saprophyticus* seja frequentemente isolado de salames do sul da Europa, não representa a principal espécie isolada de salames fermentados, como o *Staphylococcus xylosus* (MAURIELLO et al., 2004).

Como cita Essid et al. (2007), *Staphylococcus xylosus* é a espécie mais predominantemente isolada de salames Italianos e em Chorizo espanhol. Também Fontán et al (2007) em um trabalho realizado com salames de suínos tradicionais da Espanha “Androlla”, a espécie mais isolada entre *Staphylococcus* foi o *Staphylococcus xylosus*.

As características das cepas selecionadas como *Staphylococcus xylosus* estão apresentadas na Tabela 3. As cepas produzem ácido de D-glucose, D-frutose, D-manose, maltose, lactose, D-trehalose, D-manitol, xilitol, xilose, sacarose, N-acetil-glucosamina, mas não produzem ácido de D-melibiose, rafinose,  $\alpha$ -metil-D-glucosídeo, reduz nitratos e nitritos, produz acetoina, apresenta fosfatase alcalina e

urease, mas não hidrolisa a arginina. Estas características da espécie *Staphylococcus xylosus* estão de acordo com HOLT et al. (1994).

**Tabela 3** - Características das cepas isoladas de salames artesanais através do Kit Api Staph como *Staphylococcus xylosus*

<b>Característica</b>	<b><i>Staphylococcus xylosus</i></b>
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Manose	+
Maltose	+
Lactose	+
D-Trehalose	+
D-Manitol	+
Xilitol	+
D-Melibiose	-
Rafinose	-
Xilose	+
Sacarose	+
$\alpha$ -metil-D-glucosídeo	-
N-acetil-glucosamina	+
Redução de nitratos e nitritos	+
Fosfatase alcalina	+
Produção de acetoína (acetilmetilcarbonil)	+
Hidrólise arginina	-
Urease	+

Drosinos et al. (2005), isolaram cepas de *Staphylococcus xylosus*, que apresentaram características típicas da espécie, tais como redução de nitrato e produção de ácido a partir de xilose e manose, mas não de rafinose. A maioria das cepas também produziu acetoína e sobreviveu até o fim do processo, visto que as cepas foram isoladas durante a fase final maturação. Também mostraram atividade urease.

A redução de nitrato, usualmente é o primeiro critério de seleção para uso como cultura *starter*, devido à contribuição na formação da cor (GARCIA-VARONA et al., 2000).

A atividade nitrato redutase participa no desenvolvimento e estabilidade da cor vermelha em produtos cárneos, pela formação da mioglobina nitrosa, além disso produz nitrito que pode limitar a oxidação lipídica (TALON et al., 1999).

A produção de catalase, nitrato redutase e a redução do oxigênio na superfície do produto, contribuem para a liberação das enzimas proteases e lipases, que auxiliam no desenvolvimento do *flavor*. Várias substâncias aromáticas e ácidos orgânicos são realçados devido a formação de componentes de baixo peso molecular incluindo peptídeos, aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos graxos livres (SIMONOVÁ et al.; 2006).

Papamanoli et al. (2002) isolando *Micrococcaceae* de salames fermentados, destacaram que 60% das cepas de *Staphylococcus xylosus* produziram acetoina, contribuindo positivamente para produção de aroma em salames, 50% das cepas apresentaram atividade fosfatase alcalina e 20% N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase. Também todas as cepas de *Staphylococcus xylosus* apresentaram atividade contra *Listeria monocytogenes*.

Samelis et al. (1998), selecionaram cepas de *Staphylococcus xylosus* que produziam ácido a partir de xilose, arabinose e manose e não produzia de rafinose e tinham um pigmento amarelo pálido. Entretanto, encontrou alguns *Staphylococcus xylosus* atípicos que não usavam xilose, mas eram capazes de catabolizar arabinose.

#### 4. CONCLUSÃO

Considerando o presente estudo concluiu-se que das 15 cepas isoladas da microbiota natural de salames coloniais da região central do RS, 2 cepas foram identificadas como *Staphylococcus xylosus*.

Portanto, seria bastante promissor ampliar à disponibilidade de linhagens para uso industrial, com características perfeitamente conhecidas, provenientes da seleção de culturas nativas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003.

CAMPAGNOL, P. C. **Cultura starter produzida em meio de cultura de plasma suíno e antioxidante natural na elaboração de salame**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, 2007

COPPOLA, R.; IORIZZO, M.; SAOTTA, R.; SORRENTINO, E.; GRAZIA, L. Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. **Food Microbiology**. v.14, p. 47-53, 1997.

CUNHA, M. L.; SINZATO, Y. K.; SILVEIRA, L. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.99, n.8, 2004.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; MOSCHONAS, G.; GAITIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v.69, p.307-317, 2005.

ESSID, I.; ISMAIL, H. B.; AHMED, S. B. H.; GREDAMSI, R.; HASSOUNA, M. Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. **Meat Science**. v.77, p.204-212, 2007.

FONTÁN, M.C.G.; LORENZO, J.M.; PARADA, A.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological characteristics of "androlla", a Spanish traditional pork sausage. **Food Microbiology**. v. 24, p. 52-58, 2007.

GARCIA-VARONA, M.; SANTOS, E. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of Chorizo. **International Journal of Food Microbiology**. v.54, p.189-195, 2000.

HAMMES, W. P. Bacterial starter cultures in food production. **Food Biotechnology**, v. 4, p. 383-387, 1990.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Science**, v. 49, p.125-138, 1998.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3 ed. Editora Academic Press, California, 1998.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of determinative Bacteriology**, 9.ed. USA: Philadelphia,1994.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**. v. 67, p.149–158, 2004.

PAPAMANOLI, E.; KOTZEKIDOU, P.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. **Food Microbiology**, v. 19, p.441-449, 2002.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; VLASSI, M.; PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p.69-82, 1998.

SILVA, C. H. P M.; LINS, A. P.; CRUZ, C.S.O. Avaliação do sistema staph-id para identificação de *Staphylococcus* isolados a partir de espécies clínicos humanos. **RBAC**. v.38, p. 7-9, 2006.

SIMONOVÁ, M.; STROMPFOVÁ, V.; MARCINÁKOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; VESTERLUND, S.; MORATALLA, M. L.; BOVER-CID, S.; VIDAL-CAROU, C. Characterization of *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. **Meat Science**. v. 73, p. 559-564, 2006.

SONDERGAARD, A. K.; STAHNKE, L. H. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum* – a comparative study in model systems. **International Journal of Food Microbiology**. v. 75, p. 99-109, 2002.

SORENSEN, B. B.; JOKOBSEN, M. The combined effects of environmental conditions related to meat fermentation on growth and lipase production by the starter culture *Staphylococcus xylosus*. **Food Microbiology**, v. 13. p. 265-274, 1996.

TALON, R.; WALTER, D.; CHARTIER, S.; BARBIÉRE, C.; MONTEL, M. C. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.52, p. 47-56, 1999.

ZUBER, A. D.; HORVAT, M. Influence of starter cultures on the free fatty acids during ripening in Tea sausages. **Eur. Food Res. Technol**, v.224, n.4, p.511-517, 2007.

## 3.2 ARTIGO 2

### ***LACTOCOCCUS LACTIS SSP LACTIS* FERMENTADO EM MEIO DE CULTURA DE PLASMA SUÍNO<sup>1</sup>**

**Andréia CIROLINI<sup>2</sup>, Leadir L. M. FRIES<sup>3\*</sup>, Nelcindo N. TERRA<sup>3</sup>,  
Liana I. G. MILANI<sup>4</sup>, Diala URNAU<sup>2</sup>, Bibiana Al. dos SANTOS<sup>5</sup>,  
Giovanna D. CERVO<sup>5</sup>**

Em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à Meat Science.

---

<sup>1</sup> Manuscrito recebido em

<sup>2</sup> Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCR, UFSM.

<sup>3</sup> Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. \*E-mail: [lucymicro@yahoo.com.br](mailto:lucymicro@yahoo.com.br).

<sup>4</sup> Técnica de Laboratório de Microbiologia, CCR, UFSM.

<sup>5</sup> Graduação em Farmácia e Bioquímica, CSS, UFSM.

\*A quem a correspondência deve ser enviada.

## RESUMO

A adição de culturas *starters* em produtos cárneos permite alta conservação, redução do tempo de fermentação e uma uniformidade entre os produtos. Normalmente as culturas *starters* são compostas por bactérias ácido lácticas combinadas *Staphylococcus* coagulase negativa. Para o isolamento e multiplicação das bactérias ácido lácticas o meio de cultura mais empregado em escala laboratorial é o caldo MRS. No entanto, o seu alto custo torna inviável a sua utilização na produção comercial destas bactérias. A pesquisa teve como objetivo crescer uma cultura *starter* de *Lactococcus lactis ssp lactis* utilizando um meio de cultura de baixo valor comercial (plasma de suíno) e avaliar sua eficiência em relação ao meio de cultura tradicional (MRS). O microrganismo *Lactococcus lactis ssp lactis* foi fermentado em meio de cultura à base de plasma suíno e também em caldo MRS. Durante o processo fermentativo foram coletadas amostras para quantificar o crescimento de bactérias ácido lácticas através de análises microbiológicas e densidade óptica (610nm). Após atingir a concentração ótima de células viáveis, o meio fermentado foi centrifugado e a biomassa congelada, para posterior aplicação como cultura *starter*. Em relação à fermentação em meio de cultura a base de plasma suíno, a concentração inicial de células viáveis de *Lactococcus lactis ssp lactis* foi de 5,52 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e alcançou seu crescimento máximo no tempo de 27 horas com 8,58 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e densidade óptica de 0,88 nm. Já a fermentação em caldo MRS, a concentração inicial era de 6,75 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e ao final de 6 horas atingiu seu pico máximo de 8,70 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e densidade óptica de 0,81 nm. Pode-se concluir que o meio de cultura à base de plasma suíno foi eficiente na multiplicação de *Lactococcus lactis ssp lactis* e apresentou um desempenho semelhante à fermentação do meio de cultura comercial, podendo ser um meio econômico para a multiplicação de bactérias ácido lácticas, além de contribuir para diminuir problemas ambientais.

Palavras-chave: fermentação, plasma suíno, *Lactococcus lactis ssp lactis*.

## ABSTRACT

**LACTOCOCCUS LACTIS SSP LACTIS FERMENTED IN PORK PLASMA CULTURE MEDIUM**

The addition of *starter* cultures in meat products allows high conservation, shorten ripening time and standardize among the products. *Starters* cultures usually consist of lactic acid bacteria associated with *Staphylococcus*. For the isolation and multiplication of the lactic acid bacteria the MRS broth is highly used in laboratorial scale. However, its high cost becomes impracticable its use in the commercial production of these bacteria. The aimed of this study was to grow a *starter* culture of *Lactococcus lactis ssp lactis* using a culture medium of low commercial value (pork plasma) and to evaluate its efficiency in relation to the traditional culture medium (MRS). The *Lactococcus lactis ssp lactis* was fermented in pork plasma culture medium and also in broth MRS. During the fermentation process samples have been collected to quantify the growth of lactic acid bacteria acid through microbiological analyses and optic density (610nm). After the viable cells reached the high concentration, the fermented medium was centrifugated and the biomass stored at -18°C until use as *starter* culture. In relation to the fermentation in pork plasma medium the initial concentration of viable cells of *Lactococcus lactis ssp lactis* was 5.52 Log UFC.mL<sup>-1</sup> and the peak of maximum growth was at 27 hours with 8.58 Log UFC.mL<sup>-1</sup> and 0.88 nm optical density. When *Lactococcus lactis ssp lactis* was fermented in MRS broth, the initial concentration was 6.75 Log UFC.mL<sup>-1</sup> and at the end of 6 hours it reached its maximum peak growth on 8.70 Log UFC.mL<sup>-1</sup> and optic density of 0.81. It can be concluded that the pork plasma culture medium was efficient in the multiplication of *Lactococcus lactis ssp lactis* and showed a similar fermentation performance compared to the commercial culture medium, being able to be an economic resource for the multiplication of lactic acid bacteria, besides contributing for less ambient pollution.

keywords: fermentation, pork plasma medium, *Lactococcus lactis ssp lactis*

## 1. INTRODUÇÃO

A maioria das culturas *starters* utilizadas em produtos cárneos são compostas de bactérias ácido lácticas, responsáveis pelo decréscimo do pH e

consequentemente pela conservação e *Staphylococcus* coagulase negativa que promovem o *flavor* aos produtos fermentados (Essid et al., 2007).

Para o isolamento e multiplicação das bactérias ácido lácticas, o meio de cultura mais empregado em escala laboratorial é o caldo MRS (Ágar de Man, Rogosa e Sharpe), devido suas fontes de nitrogênio. No entanto, o seu alto custo torna inviável a sua utilização na produção comercial destas bactérias (De Man et al., 1960; Zhang & Greasham, 1999).

Por outro lado, a indústria cárnea produz toneladas de sangue em seus frigoríficos, causando um problema ambiental, devido altos volumes gerados e pela alta carga poluente. Entretanto, o sangue possui um componente de valor biológico e econômico que são as proteínas (Viana et al., 2005; Del Hoyo et al., 2007).

A maioria das proteínas do sangue são encontradas no plasma, com exceção da hemoglobina, e é formado basicamente de 7% de proteína e 91% de água (Moure et al., 2003).

Como alternativa para diminuir problemas ambientais e prevenir a perda de fonte disponível de nitrogênio, estudos estão sendo realizados para utilizar o plasma bovino como um meio de cultura para o isolamento e multiplicação das bactérias ácidos lácticas com o intuito de substituir o caldo MRS (Barboza et al., 1997; Hyun & Shin, 1998).

Em vista disso, este trabalho teve como objetivo produzir uma cultura *starter* de *Lactococcus lactis ssp lactis* utilizando um meio de cultura de plasma suíno e avaliar sua eficiência em relação ao meio de cultura tradicional (MRS).

## **2. MATERIAS E MÉTODOS**

### **2.1 Microrganismo**

Foi utilizada uma cepa de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolada de produtos lácteos por Cirolini et al. (2007). A cepa isolada foi armazenada à 4°C em tubo contendo ágar MRS.

### 2.1.1 Preparo do inóculo para fermentação

O preparo do inóculo iniciou com a reativação da cepa de *Lactococcus lactis ssp lactis* mantida em ágar MRS, sob refrigeração. A cepa foi transferida para caldo MRS e incubada a 37°C, por 48 horas.

## 2.2 Elaboração da cultura *starter* em plasma suíno

### 2.2.1 Obtenção e fracionamento do sangue suíno

Através do abate de suínos em um frigorífico sob Inspeção Federal, foi coletado o sangue em frascos contendo quantidade necessária de anticoagulante (1% de citrato de sódio). A coleta foi obtida diretamente da ferida de sangria, evitando-se o contato entre a vasilha coletora e a pele do animal.

Após liberado pela Inspeção Federal, o sangue foi imediatamente levado ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos – UFSM, onde foi centrifugado a 3000 rpm por 25 min para separação das células vermelhas (hemáceas) e do plasma. O plasma foi transferido para saquetas esterilizadas e mantido a -18°C, até o momento de sua utilização.

### 2.2.2 Preparação do meio de cultura de plasma suíno

A elaboração do meio de cultura para propagação do *Lactococcus* foi baseada nas recomendações de Barboza et al (1997), com algumas modificações. Misturou-se 450 mL de plasma suíno com 450 mL de água destilada, ajustando-se o pH para 11,0 com NaOH 1N. Após, esta solução foi esterilizada (121°C/15') e misturada com 600 mL de solução esterilizada contendo glicose (15g) e difosfato de potássio (4,5g).

### 2.2.3 Cultivo do *Lactococcus lactis ssp lactis* em plasma suíno

Foi inoculado no meio de cultura de plasma suíno 1% (v/v) do inóculo em relação ao volume total. A fermentação foi realizada em fermentador (MARCONI) com capacidade de 3 L, usando um volume de trabalho de 1,5 L. O pH foi mantido em 7,0 com a adição de NaOH 8% e as condições para o cultivo foram agitação de 100 rpm e temperatura de 37°C (+ou - 0,1°C).

### 2.2.4 Avaliação do fermentado em plasma suíno

Para o monitoramento do processo fermentativo durante as primeiras 18 horas, foram coletadas amostras, em duplicata, em frascos estéreis, no intervalo de 6 horas. Após este período, as amostras passaram a ser coletadas em intervalos de 3 horas.

A contagem de células viáveis foi realizada mediante contagem padrão em placas, usando ágar MRS. As placas foram inoculadas em estufa bacteriológica a 37°C, por 48 horas (Siqueira, 1995). O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>) de amostra. A densidade ótica foi estimada por leitura espectrofotométrica a 610nm, utilizando-se espectrofotômetro (LAMBDA 2S MODELO PERKIN ELMER).

### 2.2.5 Manutenção da cultura *starter* fermentada em plasma suíno

Após a cepa de *Lactococcus lactis ssp lactis* entrar na fase estacionária, verificado através da suspensão da adição de hidróxido de sódio no meio de plasma suíno, uma alíquota do meio fermentado foi centrifugada a 3000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a biomassa foi lavada e ressuspensa a 10% (w/v) em leite desnatado esterilizado e congelada à -18°C.

## 2.3 Elaboração da cultura *starter* em caldo MRS

### 2.3.1 Cultivo do *Lactococcus lactis ssp lactis* em caldo MRS

Foi inoculado no caldo de MRS 1% (v/v) do inóculo em relação ao volume total. A fermentação foi realizada em fermentador (MARCONI) com capacidade de 3 L, usando um volume e trabalho de 1,5 L. As condições para o cultivo foram agitação de 100 rpm e temperatura de 37°C (+ou – 0,1°C ).

### 2.3.2 Avaliação do fermentado em caldo MRS

Em intervalos de 3 horas foram coletadas amostras, em duplicata, em frascos estéreis. A contagem de células viáveis foi realizada mediante contagem padrão em placas, usando ágar MRS. As placas foram inoculadas em estufa bacteriológica a 37°C, por 48 horas (Siqueira, 1995). O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>) de amostra. A densidade ótica foi estimada por leitura espectrofotométrica a 610nm, utilizando-se espectrofotômetro (LAMBDA 2S MODELO PERKIN ELMER).

O pH do meio de fermentação também foi determinado de acordo com Terra & Brum (1988). Durante as primeiras 6 horas, foram coletadas amostras, no intervalo de 3 horas. Após este período, as amostras passaram a ser coletadas em intervalos de 1 hora.

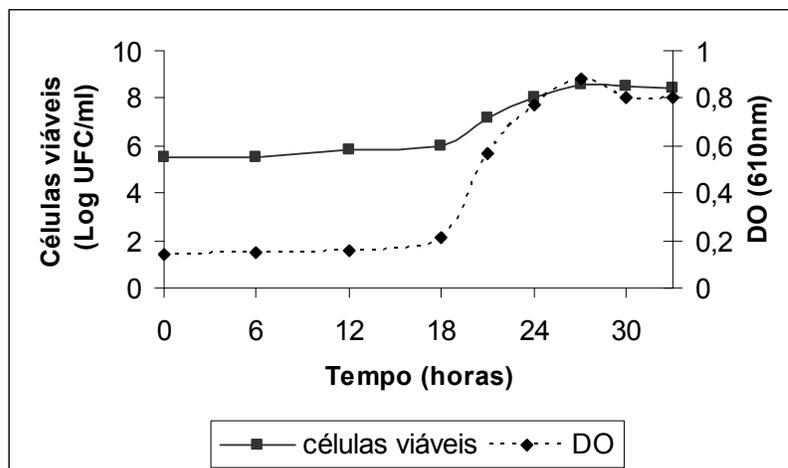
### 2.3.3 Manutenção da cultura *starter* fermentada em caldo MRS

Após a cepa de *Lactococcus lactis ssp lactis* entrar na fase estacionária, verificado através da manutenção do pH, uma alíquota do meio fermentado foi centrifugada a 3000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a

biomassa foi lavada e ressuspensa a 10% (w/v) em leite desnatado esterilizado, congelada à -18°C.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a fermentação em meio de cultura de plasma suíno, a concentração inicial de células viáveis de *Lactococcus lactis ssp lactis* foi de 5,52 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e alcançou seu crescimento máximo (8,58 Log UFC.mL<sup>-1</sup>) no tempo de 27 horas, vindo posteriormente a decrescer. A densidade óptica apresentou comportamento semelhante, com pico máximo de 0,88. A curva de crescimento e a densidade óptica a 610nm do cultivo de *Lactococcus lactis ssp lactis* em meio de plasma suíno encontra-se na Figura 1.



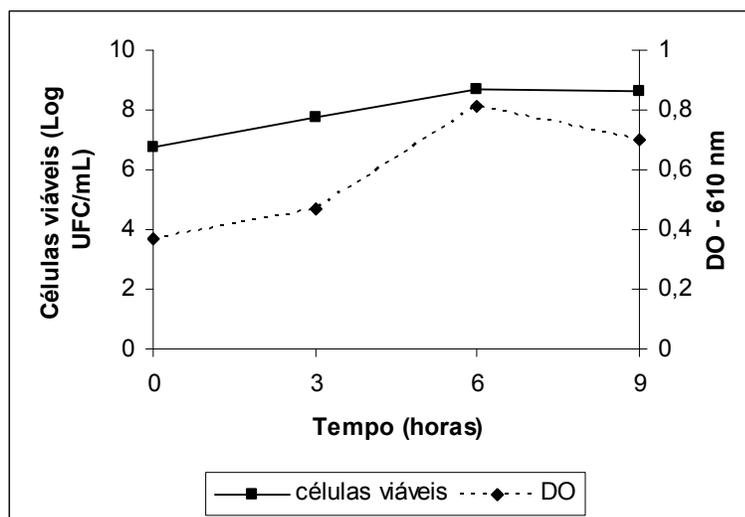
**Figura 1.** Curva de crescimento e densidade óptica a 610 nm do cultivo de *Lactococcus lactis ssp lactis* em meio de cultura de plasma suíno.

O final do processo de fermentação foi concluído com 33 horas, quando o pH tornou-se constante em torno de 6,4, não necessitando mais a adição de NaOH 8%.

De acordo com Del Hoyo et al. (2007), a solubilidade mínima obtido do plasma é em torno de pH 6,4. Tsumura et al. (2005) acrescentam que neste pH a rede de proteínas são bastante fracas, de modo que sua solubilidade diminui.

Campagnol (2007) desenvolveu um trabalho utilizando plasma suíno para fermentação de *Lactobacillus plantarum*, onde a cepa alcançou seu crescimento máximo no tempo de 30 horas com 9,82 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e densidade óptica de 0,83, vindo posteriormente a decrescer.

A curva de crescimento e a densidade óptica a 610nm do cultivo de *Lactococcus lactis ssp lactis* em caldo MRS encontra-se na Figura 2.



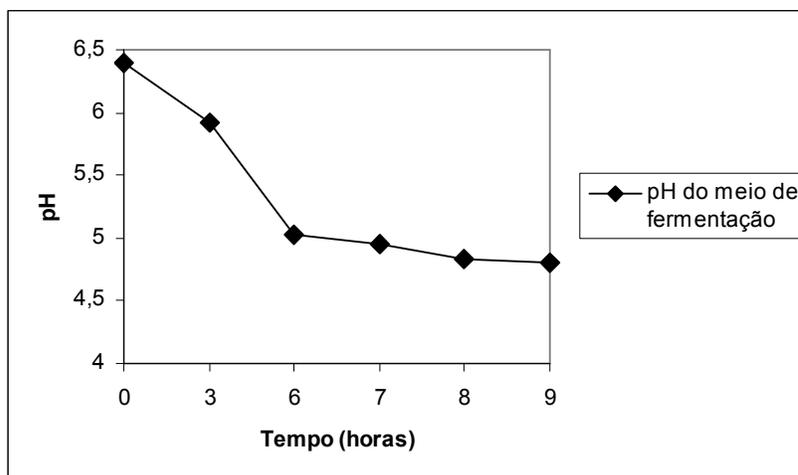
**Figura 2.** Curva de crescimento e densidade óptica a 610 nm do cultivo de *Lactococcus lactis ssp lactis* em caldo MRS.

Pode-se observar que a fermentação em caldo MRS a concentração inicial era de 6,75 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e ao final de 6 horas atingiu seu pico máximo de 8,70 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e densidade ótica de 0,81.

Sawitzki (2000) realizou trabalho semelhante multiplicando *Lactococcus lactis ssp lactis* em caldo MRS, onde observou que com 6h de fermentação a cepa obteve uma leitura espectrofotométrica em 0,216 e o pico na contagem de colônias de 8,76 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. O pH 4,76 constatado no meio de fermentação sinalizou a fase final do processo de fermentação.

O desenvolvimento da cepa demonstrou como produto de seu metabolismo a formação de ácido, constatado pela redução do pH do meio de fermentação de 6,40 para 5,02 quando atingiu a contagem de colônias de 8,70 Log UFC.mL<sup>-1</sup> em um período de 6 horas, e o pH de 4,81 em 9 horas (Figura 3).

De acordo com Mundt (1986) espécies de *Lactococcus lactis* têm pH final de 4,0 a 4,5 em caldo de glucose. Portanto, baseado nestes dados e valores constantes expressos nas últimas 3 horas de leitura, ao final de 9 horas de fermentação, obteve-se a fase final do processo.



**Figura 3.** Variação de pH do meio de fermentação durante o período de crescimento do *Lactococcus lactis ssp lactis* em caldo MRS.

Pode-se observar que os valores alcançados pela fermentação em meio de plasma suíno e a multiplicação em caldo MRS, foram semelhantes, observados com mais clareza na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores da contagem e densidade óptica do *Lactococcus lactis ssp lactis* em meio de plasma suíno e em caldo MRS.

Fermentação	Log UFC.mL <sup>-1</sup> Inicial	Log UFC.mL <sup>-1</sup> Final	DO – 610 nm
Plasma suíno	5,52	8,58	0,88
Caldo MRS	6,75	8,70	0,81

Em relação ao custo médio aproximado, para preparar 1,5L de caldo MRS custa em média R\$ 129.03. Por outro lado, para a preparação de 1,5L de plasma

suíno tem-se um gasto de R\$ 9.00 aproximadamente. Logo, nessas condições, a utilização do plasma suíno apresenta vantagens sobre o caldo MRS.

Hyun & Shin (1998) desenvolveram um trabalho de comparação da fermentação com caldo MRS e um hidrolizado enzimático de plasma bovino, em cepas de *Lactobacillus sp.* Observaram que o meio de cultura produzido apresentou crescimento de bactérias ácido lácticas significativamente alto, com crescimento máximo de 9,71 Log UFC. mL<sup>-1</sup> e no caldo MRS de 9,85 Log UFC. mL<sup>-1</sup>. Também destacaram que o custo do caldo MRS comparado com o plasma bovino é mais elevado devido às fontes de nitrogênio complexas que possui.

Um trabalho realizado por Márquez et al. (2005), não encontraram diferença significativa entre a quantidade de proteínas do plasma bovino (7,21%) e do plasma suíno (6,65%), mas encontraram uma diferença no valor de proteína do plasma de aves (3,46%). Dávila et al. (2007) acrescentaram que o sangue suíno é um importante sub-produto da indústria cárnea, ressaltando a composição das proteínas do plasma, a qual possui 50-60% de albumina, 40-50% de globulina e 1-3% de fibrinogênio.

Barboza et al. (1997) também realizaram um trabalho onde utilizaram plasma bovino na elaboração de um meio de cultura alternativo ao caldo MRS. Verificaram que o crescimento das bactérias ácido lácticas no meio de cultura produzido foi similar ao crescimento no caldo MRS, além de apresentar um custo extremamente inferior ao meio comercial.

#### **4. CONCLUSÃO**

O meio de cultura de plasma suíno foi eficiente na multiplicação de *Lactococcus lactis ssp lactis* e apresentou um desempenho semelhante à fermentação do meio de cultura comercial MRS. Desta forma, torna-se uma alternativa de menor custo para a multiplicação de bactérias ácido lácticas, além de contribuir para diminuir problemas ambientais.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Barboza, Y.; Marquez, E.; Gomez, O.; Rangel, L. (1997). Development of a bovine plasma medium for propagation of Lactobacilli. *J. Food Sci. Tech.* , 34(2), 261-263,

Campagnol, P. C. Cultura starter produzida em meio de cultura de plasma suíno e antioxidante natural na elaboração de salame. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

Cirolini, A.; Fries, L. L.M.; Terra, N. N.; Milani, L. I. G.; Urnau, D.; Santos, B. A.; Rezer, A.P.S.; Padilha, V.S.; Trevisan, A. P. Isolamento de Lactobacillus com propriedades probióticas. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 7, 2007, Campinas. Anais...Campinas, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007. CD-ROM.

Dávila, E.; Parés, D.; Cuvelier, G.; Relkin, P. Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science.* v.76, p.216-225, 2007.

De Man, J. C.; Rogosa, M.; Shape, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* v.23, p.130-135, 1960.

Del Hoyo, P.; Rendueles, M. Díaz, M. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, v.78, n. 4, p. 522-528, 2007.

Del Hoyo, P.; Moure, F.; Rendueles, M. Díaz, M. Demineralization of animal blood plasma by ion Exchange and ultrafiltration. *Meat Science*, v. 76, p.402-410, 2007.

Essid, I.; Ismail, H. B.; Ahmed, S. B. H.; Gredamsi, R.; Hassouna, M. Characterization and technological properties of Staphylococcus xylosus strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science.* v.77, p.204-212, 2007.

Hyun, C. K.; Shin, H. K. Utilization of bovine blood plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 86, n.1, p. 34-37, 1998.

Márquez, E.; Bracho, M.; Archile, A.; Rangel, L.; Benítez, B. Proteins, isoleucine, lysine and methionine content of bovine, porcine and poultry blood and their fractions. *Food Chemistry.* v. 93, p. 503-505, 2005.

Moure, F.; Rendueles, M.; Díaz, M. Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography. *Meat Science*, v. 64, p. 391-398, 2003.

Mundt, J. O. Lactic Acid Streptococci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v.2, 1986.

Sawitzki, M. C. Caracterização de Bactérias Ácidos Láticas isoladas de Salames Artesanais e aplicadas como culturas iniciadoras em Salame Tipo Italiano, 2000. 53 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

Siqueira, S. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: Embrapa, 1995.

Terra, N. N.; Brum, M. A. R. Carne e Seus Derivados. São Paulo: Ed. Nobel. 1988. 121p.

Tsumura, k.; Saito, T.; Tsuge, K.; Ashida, H.; Kugimiya, W.; Inouye, K. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *Food Science Technology*, v. 38, p. 225-261, 2005.

Viana, F. R.; Silva, V. D. M.; Delvivo, F. M.; Bizzotto, C. S.; Silvestre, M. P. C. Quality of ham patê containing bovine globin and plasma as fat replacers. *Meat Science*, v. 70, p. 153-160, 2005.

Zhang, J. Greasham, R. Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 51, n. 4, p. 407-421, 1999.

### 3.3 ARTIGO 3

## **SALAME TIPO ITALIANO ELABORADO COM CULTURAS STARTERS NATIVAS<sup>1</sup>**

**Andréia Cirolini<sup>2</sup>, Leadir Lucy Martins Fries<sup>3\*</sup>, Nelcindo  
Nascimento Terra<sup>3</sup>, Liana Inês Guidolin Milani<sup>4</sup>, Diala Urnau<sup>2</sup>,  
Bibiana Alves dos Santos<sup>5</sup>, Giovanna Dotta Cervo<sup>5</sup>**

Em fase final de revisão pelos autores para ser submetido à Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.

---

<sup>1</sup> Manuscrito recebido em

<sup>2</sup> Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCR, UFSM.

<sup>3</sup> Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. \*E-mail: [lucymicro@yahoo.com.br](mailto:lucymicro@yahoo.com.br).

<sup>4</sup> Técnica de Laboratório de Microbiologia, CCR, UFSM.

<sup>5</sup> Graduação em Farmácia e Bioquímica, CSS, UFSM.

\*A quem a correspondência deve ser enviada.

**RESUMO**

A pesquisa teve como objetivo acrescentar culturas *starters* nativas em salame tipo Italiano e avaliar o desempenho frente a culturas comerciais quanto as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais. As culturas utilizadas foram *Staphylococcus xylosum*, anteriormente isolado de salames coloniais e fermentado em ágar Baird Parker e *Lactococcus lactis ssp lactis* previamente isolado de um produto lácteo e fermentado em meio de cultura de plasma suíno. Elaboraram-se quatro partidas de salame, considerando os seguintes tratamentos: T1 - adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosum* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2 - mistura de *Staphylococcus xylosum* isolado mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3 - mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolado mais *Staphylococcus xylosum* comercial e T4 - *Staphylococcus xylosum* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados. Determinou-se a contagem de bactérias ácido lácticas, *Micrococcaceae*, *Staphylococcus xylosum*, coliformes totais e fecais, *Salmonella sp*, *Staphylococcus* coagulase positiva, pH, Aa, perda de peso, oxidação lipídica (TBARS), nitrito, cor e análise sensorial dos salames. Os tratamentos apresentaram uma queda de pH significativa e também uma redução na atividade de água, garantindo uma segurança microbiológica aos produtos. Em relação à oxidação lipídica os tratamentos que continham *Staphylococcus xylosum* isolados de salames artesanais (T2 e T4) apresentaram valores menores que os outros tratamentos. Os salames elaborados com *Staphylococcus xylosum* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados apresentaram melhores resultados sensoriais quando comparados com salames elaborados com culturas *starters* comerciais. Portanto, a adição de culturas *starters* nativas pode ser utilizada na elaboração de salames, proporcionando produtos seguros e com *flavor* diferenciado.

Palavras-chave: culturas *starters*; salame; *Staphylococcus xylosum*; *Lactococcus lactis ssp lactis*

**ABSTRACT**

**FERMENTED ITALIAN SAUSAGE ELABORATED WITH NATIVE STARTERS CULTURES**

The objective of this paper was to add native *starters* cultures in fermented Italian sausages and evaluated the performance front the commercial cultures, the microbiological and physico-chemical parameters and sensorial characteristics. The used cultures was *Staphylococcus xylosus*, previously isolated from colonial sausages and fermented in BAIRD PARKER agar, and *Lactococcus lactis ssp lactis* previously isolated from dairy product and fermented in pork plasma medium. Four departures of sausages were elaborated, considering the following treatments: T1 - addition of commercial *starters* (*Staphylococcus xylosus* and *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2 - mixture of isolated *Staphylococcus xylosus* more commercial *Lactococcus lactis ssp lactis*; T3 - mixture of isolated *Lactococcus lactis ssp lactis* more commercial *Staphylococcus xylosus* T4 - *Staphylococcus xylosus* and *Lactococcus lactis ssp lactis* both isolated. It was determined counting of lactic acid bacteria, total and fecal coliforms, *Micrococcaceae*, *Staphylococcus xylosus*, *Salmonella sp*, coagulase positive cocci, pH, Aw, weight loss, lipid oxidation (TBARS), nitrite, colour and sensorial analysis of the sausages. The treatments showed a significant decreased of pH and a reduction in the water activity, ensuring a microbiological security to the products. In relation to the lipid oxidation, the treatments that contained isolated strains of *Staphylococcus xylosus* (T2 and T4) presented significantly lower values than the other treatments. The sausages elaborated with *Staphylococcus xylosus* and *Lactococcus lactis ssp lactis* both strains isolated presented better sensorial results than the sausages elaborated with commercial *starters* cultures. Therefore, the addition of natives *starters* cultures can be used in the elaboration of fermented Italian sausages, providing safe products and with differentiated flavor.

Keywords: native *starters* cultures; fermented Italian sausages; *Staphylococcus xylosus*; *Lactococcus lactis ssp lactis*

## 1. INTRODUÇÃO

A fermentação é uma das mais antigas tecnologias utilizadas para conservação dos alimentos. No passado, a fermentação era um resultado

espontâneo da microflora natural da carne e do ambiente. Entretanto, a fermentação descontrolada pode produzir produtos inferiores ou mesmo inseguros para o consumo (ESSID et al., 2007).

Em 1957, ocorreu a introdução comercial de culturas puras de microrganismos, chamadas culturas *starters*, aos produtos fermentados permitindo uniformidade entre os produtos, redução do tempo de fermentação e uma alta conservação do produto (VURAL, 1998).

Duas categorias de microrganismos são comumente utilizadas como culturas *starters*, ou seja, as bactérias ácido lácticas que promovem a segurança e estabilidade do produto e *Staphylococcus* coagulase negativa responsáveis por estabilizar a cor, prevenir a rancificação e realçar compostos aromáticos dos produtos cárneos (DROSINOS et al., 2001).

Terra (2003) destaca que a produção de salame do Brasil depende da importação integral das culturas *starters*, o que acarreta num desequilíbrio da balança comercial além de levar ao esquecimento do sabor genuinamente brasileiro.

Greco et al. (2005) e MORETTI et al. (2004) acrescentam que salames artesanais apresentam melhores características sensoriais que salames industriais, devido à composição e atividade metabólica da microflora indígena.

Portanto, o presente trabalho teve como finalidade acrescentar culturas *starters* nativas, em salame tipo Italiano e avaliar seu desempenho frente a culturas comerciais, quanto suas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais.

## **2. MATERIAS E MÉTODOS**

### **2.1. Cultura iniciadoras**

As cepas usadas neste estudo foram a cultura de *Staphylococcus xylosum* nativa anteriormente isolada de salames coloniais da região central do estado do RS, multiplicada em ágar Baird Parker (CIROLINI et al.; 2007a), a cultura de *Lactococcus lactis ssp lactis* nativa fermentada em meio de cultura de plasma suíno

(CIROLINI et al.; 2007b) e as cepas *Lactococcus lactis ssp lactis* doada pela Fundação André Tosello, Campinas/SP e Floracarn SX (Chr. Hansen) contendo o microrganismo *Staphylococcus xylosus*.

## 2.2 Preparo do salame

As amostras de salame foram elaboradas de acordo com a seguinte formulação: pernil suíno (60%), retalho bovino (20%), tocinho congelado (20%), cloreto de sódio (3%), glicose (0,5%), sacarose (0,5%), mistura comercial de cura, contendo nitrato e nitrito de sódio (0,3%), ascorbato de sódio (0,25%), pimenta branca (0,2%), alho (0,5%) e noz moscada (0,02%). A carne suína foi moída em disco de 12 mm e a carne bovina em disco de 8mm. Após a moagem as carnes sofreram a adição de cloreto de sódio, misturando-se em misturadeira durante 3 minutos para a extração de proteínas miofibrilares. A seguir, foram adicionados os demais ingredientes, com exceção do ascorbato de sódio que foi acrescentado por último (TERRA, 2003).

Após a mistura, porções iguais de massa foram divididas, originando os seguintes tratamentos: Tratamento 1 (T1), adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); Tratamento 2 (T2), mistura de *Staphylococcus xylosus* isolados de embutidos artesanais mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; Tratamento 3 (T3), mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolado de produto lácteo mais *Staphylococcus xylosus* comercial e Tratamento 4 (T4), mistura de *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis*, ambos isolados. A matéria prima apresentou uma contagem de bactérias aeróbias mesófilas de  $1,3 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> sendo a quantidade de cultura *starter* adicionada de  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>.

A massa cárnea dos tratamentos foi embutida em tripas artificiais de colágeno, com 60 mm de diâmetro e cortadas em peças de aproximadamente 15 cm de comprimento. Após o embutimento, as amostras foram submetidas a um banho em solução de sorbato de potássio (20%) e encaminhadas para a câmara climatizada, com temperatura e umidade relativa controlada, onde permaneceram até atingir uma atividade de água de 0,87. A programação de temperatura e

umidade relativa (T°/UR%) foram as seguintes: primeiro dia, temperatura 25°C/U.R. 95%; segundo dia, 24°C/93%, terceiro dia, 23°C/90%, quarto dia, 22°C/85%, quinto dia, 21°C/80%, sexto dia, 20°C/75% e sétimo dia em diante, 18°C/75%. Concluída a fabricação, retiraram-se as tripas e as peças dos embutidos fermentados foram embaladas a vácuo e armazenadas à temperatura ambiente.

## 2.3 Avaliação microbiológica

Foram coletadas porções de 25 gramas de salame que foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada (0,1%) em Bag Mixer, por 2 minutos. Após, foram feitas sucessivas diluições decimais.

### 2.3.1 Contagem de bactérias ácido lácticas

A contagem de bactérias lácticas foi realizada utilizando-se o Ágar de Man, Rogosa e Sharpe - MRS. As placas foram incubadas à temperatura de +37°C por 5 dias. Foram feitas semeaduras em duplicata para cada diluição, sendo a superfície das placas recoberta com uma sobrecamada do mesmo meio para geração de uma atmosfera microaerófila (SIQUEIRA, 1995). As análises foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 da fabricação do salame.

### 2.3.2 *Micrococcaceae*

A contagem de microorganismos da família *Micrococcaceae* foi determinada pela técnica em semeadura utilizando Mannitol Salt Phenol-red ágar (MSA), incubadas a 30°C por 72 horas (STAHNKE, 1995), nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 da fabricação do salame.

### 2.3.3 *Staphylococcus xylosus*

O número de células viáveis da cultura iniciadora das amostras foi realizado nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 de fabricação do salame, utilizando a técnica de semeadura em superfície com MSA (Mannitol Salt Phenol-red ágar) e incubadas a 30°C, por 72 horas (STAHNKE, 1995).

### 2.3.4 Coliformes totais e fecais

Para a determinação de coliformes totais foi utilizada a técnica do plaqueamento por incorporação do meio de cultura ágar cristal violeta – vermelho neutro-bile com incubação a 37°C, por 24 horas. A partir das placas com desenvolvimento de coliformes totais foram determinados os coliformes fecais em caldo EC (BRASIL, 2003). As análises foram realizadas apenas nos dias 0, 7, 14 e 21 da fabricação do salame.

### 2.3.5. *Salmonella sp*

Nos dias 0 e 21 foi realizado um pré-enriquecimento em água peptonada tamponada a 37°C por 24h a partir de 25 g da mostra. Após esta etapa, foi feito um enriquecimento seletivo em caldo Tetrionato Verde Brilhante e Rappaport Vassiliadis e foram levados à estufa por 24h, a 42,5°C. A partir destes, semeou se uma alíquota em placas com ágar SS (*Salmonella Shiguella*) e ágar Rambach, e foram incubados a 37°C, por 24 horas. As colônias típicas de cada placa foram semeadas em tubos de ágar estoque; caldo uréia; ágar lisina ferro (LIA); ágar citrato de simmons; SIM, para motilidade do indol; ágar tríplice açúcar ferro (TSI), para confirmação bioquímica (BRASIL, 2003).

### 2.3.6. *Staphylococcus* coagulase positiva

A análise de *Staphylococcus* coagulase positiva foi determinada de acordo com BRASIL (2003), nos dias 0 e 21 da fabricação do salame, utilizando-se Ágar Baird-Parker a 37° C, por 48h. Após teste bioquímico da coagulase com plasma de coelho.

## 2.4 Análises físico – químicas

### 2.4.1 Determinação do pH

A medição do pH foi feita através da homogeneização de dez gramas da amostra com de água destilada (1:10 amostra/água). O homogeneizado foi submetido aos eletrodos do pHmetro Digimed, por cinco minutos, quando foi procedida a leitura do pH (TERRA & BRUM, 1988). A determinação do pH foi realizada nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 da fabricação dos salames.

### 2.4.2 Determinação da atividade de água (Aa)

Para determinação da atividade de água do salame foi utilizado o aparelho Testo 650 (modelo 0563 6501), ocorrendo as determinações nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 da fabricação dos salames.

### 2.4.3 Perda de peso

A perda de peso foi determinada pela diferença de peso existente entre as peças cárneas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 da fabricação dos salames.

#### 2.4.4 Avaliação da Oxidação Lipídica

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) resultantes da oxidação lipídica foram determinadas segundo método descrito por Raharjo *et al.* (1992). Os valores de TBARS foram determinados nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 da fabricação dos salames.

#### 2.4.5 Determinação de Nitrito

A determinação de nitrito das amostras foi realizada conforme método descrito por AOAC (1996), nos dias 0, 7, 14 e 21 da fabricação do salame.

#### 2.4.6 Determinação de cor

A determinação da cor foi realizada pelo aparelho Minolta Chroma Meter CR-300 (MINOLTA). Os resultados foram expressos como L\* (brilho), a\* (índice vermelho) e b\* (índice amarelo). As determinações foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 da fabricação dos salames.

### 2.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi determinada com 21 dias de maturação do salame. Foram avaliados as características sensoriais de cor, aroma, sabor e textura através do teste de comparação múltipla conforme descrito por Dutcosky (1996). Para a avaliação das amostras foram utilizados 20 provadores, não treinados, mas consumidores de salame.

## 2.6 Análise estatística

Os dados referentes às análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância, utilizando-se o Teste de Tukey para análises microbiológicas e físico-químicas e o Teste Dunett para análise sensorial (COSTA E NETO, 1977) através do pacote estatístico SPSS 8.0.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Análises microbiológicas

A evolução das bactérias ácido lácticas durante o período de fabricação dos salames é mostrada na Tabela 1. Verifica-se que no início da fermentação, os tratamentos T1 e T2 apresentaram uma contagem inicial de aproximadamente 7,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, a qual foi significativamente superior aos tratamentos T3 e T4. Observa-se que esta contagem mais elevada encontra-se nos tratamentos inoculados com cultura comercial de *Lactococcus lactis ssp lactis*.

Após o 3º dia de fermentação até o 14º dia de análise os tratamentos não diferiram estatisticamente, com uma contagem próxima a 8,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, permanecendo praticamente estável até o final da maturação. Apenas o tratamento

T4 aos 21 dias, apresentou uma queda de aproximadamente um ciclo logarítmico, diferindo estatisticamente do tratamento T2.

**Tabela 1.** Análises microbiológicas (Log UFC.mL<sup>-1</sup>) durante o período de fabricação dos salames formulados com diferentes culturas *starters*.

Dias	Trat*	Bactérias ácido lácticas	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Staph. xylosus</i>	Coliformes totais**	Coliformes fecais**
0	T1	6,97 <sup>a</sup>	6,20 <sup>b</sup>	5,31 <sup>b</sup>	3,73 <sup>a</sup>	<1,00
	T2	7,02 <sup>a</sup>	7,24 <sup>a</sup>	6,22 <sup>a</sup>	3,75 <sup>a</sup>	<1,00
	T3	6,30 <sup>b</sup>	6,19 <sup>b</sup>	5,26 <sup>b</sup>	3,91 <sup>a</sup>	<1,00
	T4	6,52 <sup>b</sup>	7,34 <sup>a</sup>	6,43 <sup>a</sup>	3,77 <sup>a</sup>	<1,00
3	T1	7,64 <sup>a</sup>	4,83 <sup>c</sup>	3,92 <sup>c</sup>	-	-
	T2	7,55 <sup>a</sup>	6,88 <sup>a</sup>	5,96 <sup>a</sup>	-	-
	T3	7,83 <sup>a</sup>	6,27 <sup>b</sup>	4,82 <sup>b</sup>	-	-
	T4	7,70 <sup>a</sup>	7,06 <sup>a</sup>	6,01 <sup>a</sup>	-	-
7	T1	7,71 <sup>a</sup>	5,66 <sup>d</sup>	4,63 <sup>c</sup>	1,36	<1,00
	T2	7,78 <sup>a</sup>	6,11 <sup>c</sup>	5,09 <sup>c</sup>	<1,00	<1,00
	T3	7,58 <sup>a</sup>	6,59 <sup>b</sup>	5,68 <sup>b</sup>	1,32	<1,00
	T4	7,76 <sup>a</sup>	7,89 <sup>a</sup>	7,04 <sup>a</sup>	1,58	<1,00
14	T1	8,05 <sup>a</sup>	4,64 <sup>c</sup>	3,55 <sup>c</sup>	<1,00	<1,00
	T2	7,80 <sup>ab</sup>	7,54 <sup>a</sup>	6,78 <sup>a</sup>	<1,00	<1,00
	T3	7,44 <sup>b</sup>	5,61 <sup>b</sup>	4,60 <sup>b</sup>	1,30	<1,00
	T4	7,59 <sup>b</sup>	7,50 <sup>a</sup>	6,42 <sup>a</sup>	<1,00	<1,00
21	T1	7,66 <sup>ab</sup>	4,88 <sup>c</sup>	4,09 <sup>b</sup>	<1,00	<1,00
	T2	7,90 <sup>a</sup>	6,75 <sup>b</sup>	6,00 <sup>a</sup>	<1,00	<1,00
	T3	7,66 <sup>ab</sup>	7,16 <sup>a</sup>	6,24 <sup>a</sup>	<1,00	<1,00
	T4	6,65 <sup>b</sup>	7,25 <sup>a</sup>	6,40 <sup>a</sup>	<1,00	<1,00

Médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma coluna, no mesmo dia, não apresentam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. \*T1: adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2: mistura de *Staphylococcus xylosus* isolados de embutidos artesanais mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3: mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolados de produto lácteo mais *Staphylococcus xylosus* comercial e T4: *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados. \*\*Análise de coliformes totais e fecais não foi realizada no 3° dia de fermentação.

Estes resultados estão de acordo com Rantsiou & Cocolin (2006), que afirmam que após três dias de fermentação as bactérias ácido lácticas alcançam uma contagem de 7 - 8 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, permanecendo relativamente sem alterações, em número, durante todo o período de maturação. Esta alta população de bactérias

ácida lácticas produz ácido láctico, ácido acético e possivelmente bacteriocinas que vão inibir o crescimento de bactérias patogênicas, especialmente *Staphylococcus aureus* (GEISEN et al. 1992; LUCKE, 2000).

Foi observado que, no início da fermentação, a contagem da família *Micrococcaceae* (Tabela 1) nos tratamentos T2 e T4, inoculados com *starter* de *Staphylococcus xylosus* nativos, apresentaram uma contagem de 7,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, significativamente maior que os tratamentos T1 e T3 (6,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>).

No terceiro dia de fermentação verifica-se um decréscimo no desenvolvimento da família *Micrococcaceae* nos tratamentos T1, T2 e T4, permanecendo até o final da maturação, sendo mais destacado no tratamento T1 com valor final de 4,88 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. Provavelmente este decréscimo na contagem de *Micrococaceae* deve-se ao baixamento do pH durante o processo de maturação dos salames.

Estes resultados estão de acordo com Casaburi et al. (2007), que realizaram um trabalho semelhante com o isolamento de cepas de *Staphylococcus xylosus* de salames do Sul da Itália, que foram adicionados em salames e observaram que a contagem inicial de *Micrococcaceae* foi de 6 a 7 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, sendo que após 5 dias de fermentação houve um decréscimo para 5 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, afetado pela acidificação. Também Lizaso et al. (1999) e Samelis et al. (1998) consideram que a acidificação é a causa principal da inibição do crescimento de *Micrococcaceae* na maturação de salames.

Já no tratamento T3, observa-se que houve um aumento de um ciclo logaritmo aos 21° dias de maturação. Trabalho realizado por Cocolin et al. (2001) também demonstrou um constante crescimento da família *Micrococacceae* durante a maturação de salames tipo Italiano.

Em relação à contagem de *Staphylococcus xylosus* (Tabela 1), verifica-se que no início da fermentação os tratamentos T2 e T4 inoculados com *Staphylococcus xylosus* nativos apresentaram uma contagem de 6,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, significativamente maior que os tratamentos T1 e T3 (5,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>).

No terceiro dia de fermentação, todos os tratamentos apresentaram uma queda na contagem. Stahnke (1995) cita que a sobrevivência de *Staphylococcus xylosus* é reduzida pela sensibilidade ao ácido produzido pelas bactérias ácido lácticas durante a alta temperatura de fermentação.

Essa queda permaneceu até o 21º dia de maturação nos tratamentos T1, T2 e T4, com destaque para o T1 que apresentou uma diferença significativa em relação aos outros tratamentos (4,09 Log UFC.mL<sup>-1</sup>). Já no tratamento T3, observou-se que houve um aumento de um ciclo logaritmo. FONTÁN *et al.* (2007) obteve contagem de *Staphylococcus* de 2,36 a 4,74 Log UFC.mL<sup>-1</sup> em salames coletados com 20 – 30 dias de maturação.

Os valores iniciais de coliformes totais (Tabela 1) foram baixos, demonstrando uma boa qualidade higiênico-sanitária da matéria-prima. Os coliformes totais foram progressivamente eliminados em todos os tratamentos durante a fabricação. Estes resultados ressaltam a rápida ação inibidora das culturas *starters* frente aos microrganismos indesejáveis. Também podemos observar que durante todo o período de fabricação não foi detectada, em nenhum tratamento, a presença de coliformes fecais.

Em relação à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* realizada no início e no final da fabricação do salame, esses microrganismos não foram encontrados em nenhum tratamento (dados não apresentados).

### 3.2. Análises físico-químicas

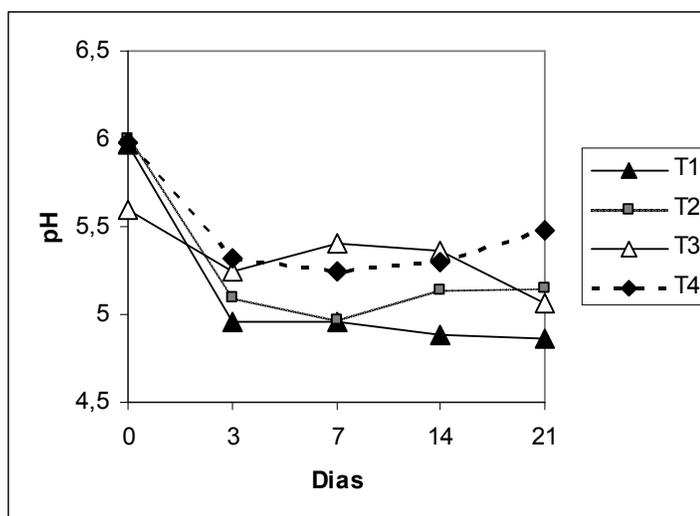
A evolução do pH durante o período de fabricação dos salames é mostrada na Figura 1. Observa-se que durante os primeiros 3 dias de fabricação, houve uma diminuição nos valores de pH em todos tratamentos. Essa queda ocorreu fundamentalmente devido ao acúmulo de ácido láctico, formado pela ação das bactérias ácido lácticas sobre os carboidratos presentes na massa cárnea, o qual irá refletir no efeito protetor contra microrganismos indesejáveis, conversão e estabilização da cor e formação de compostos desejáveis de sabor e aroma. (TERRA, 2003).

Nos tratamentos T1, T2 e T4 após os 3 dias de fermentação a queda nos valores de pH permaneceu. No tratamento T1, o decréscimo do pH continuou até o final da maturação, enquanto que após o décimo quarto dia de fermentação os tratamentos T2 e T4 apresentaram uma elevação do pH até final da maturação dos salames. Isto pode ser atribuído à produção de amônia e outros compostos tais

como peptídios, aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos graxos provindos da atividade proteolítica (MAURIELLO et al., 2004).

O tratamento T3, nos dias 7 e 14 da fermentação apresentou uma elevação do pH, vindo posteriormente a decrescer. Resultados semelhantes foram encontrados por Sawitzki (2000), onde o salame inoculado com *Lactococcus lactis ssp lactis* apresentou no 14° e 21° dias de fabricação um acréscimo nos níveis de pH e após este período o salame inoculado demonstrou redução do pH, evidenciando-se ainda o efeito acidificante no salame inoculado.

Nos 4 tratamentos analisados, os valores finais de pH variaram entre 4,87 e 5,48. Estes valores estão de acordo com Ambrosiadis *et al.* (2004), que destaca que o pH de salames tradicionais varia entre 4,67 a 6,09.

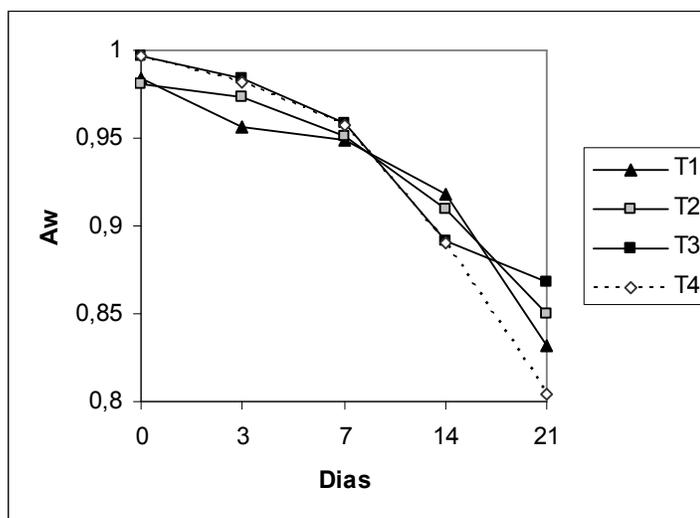


T1: adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2: mistura de *Staphylococcus xylosus* isolados de embutidos artesanais mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3: mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolados de produto lácteo mais *Staphylococcus xylosus* comercial e T4: *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados.

**Figura 1.** Evolução do pH dos salames formulados com diferentes culturas *starters*.

A atividade de água diminuiu em todos os lotes durante o processamento dos salames (Figura 2). Esta redução pode ser atribuída ao decréscimo nos valores de pH, pois a capacidade de retenção de água das proteínas da carne é diminuída quando o pH se aproxima do seu ponto isoelétrico, acelerando a desidratação e consequentemente diminuição da Aa (CHASCO et al., 1996).

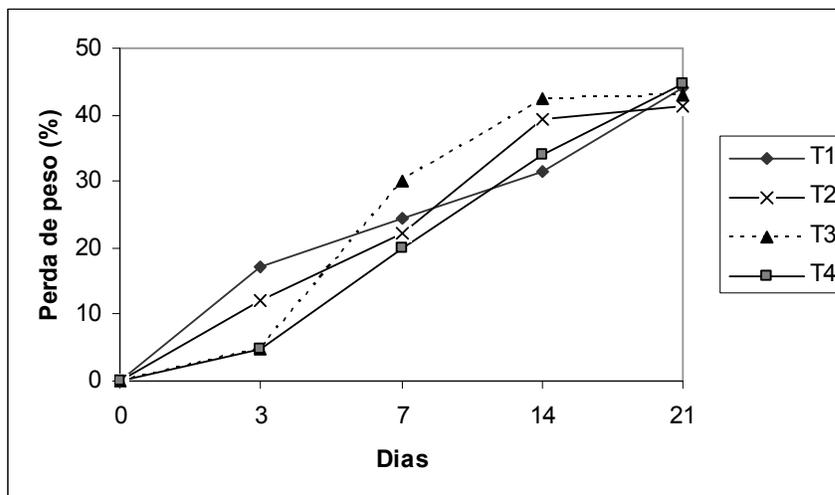
O tratamento T4 apresentou atividade de água significativamente menor que os demais tratamentos no final do processo de fabricação. Os valores finais ficaram entre 0,80 e 0,87, resultados semelhantes expressos por Cavenaghi & Oliveira (1999), onde destacam que os salames tipo Italiano nacionais, a Aa fica em torno de 0,816 e 0,868.



T1: adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2: mistura de *Staphylococcus xylosus* isolados de embutidos artesanais mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3: mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolados de produto lácteo mais *Staphylococcus xylosus* comercial e T4: *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados.

**Figura 2.** Evolução da atividade de água (Aa) dos salames formulados com diferentes culturas *starters*.

A média da perda de peso ficou em torno de 43,26% (Figura 3), estando esse valor um pouco acima da faixa de 30 a 40%, considerada ideal para os produtos fermentados secos (RUST, 1994). Valores semelhantes foram encontrados por Garcia et al (2000) no processamento de salame tipo Italiano, com uma perda de peso da ordem de 44%. Também Reis & Soares (1998) obtiveram valores entre 38,4 a 43,7% em salames coloniais.



T1: adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2: mistura de *Staphylococcus xylosus* isolados de embutidos artesanais mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3: mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolados de produto lácteo mais *Staphylococcus xylosus* comercial e T4: *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados.

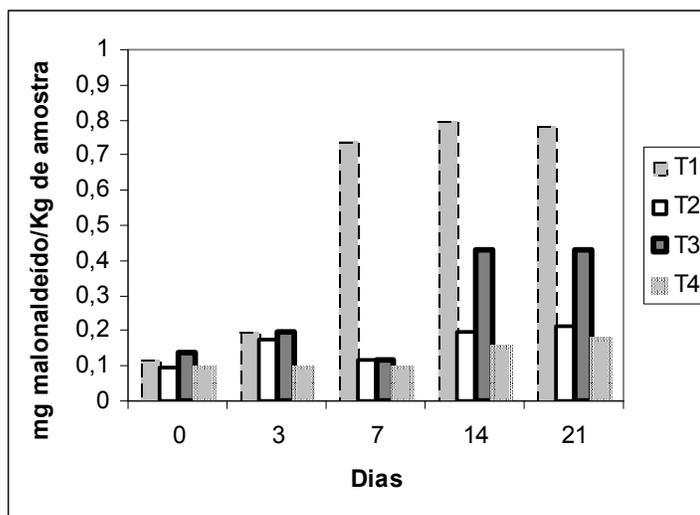
**Figura 3.** Evolução da perda de peso dos salames formulados com diferentes culturas *starters*.

O teste de TBARS é o método mais usual para acompanhar a evolução da oxidação lipídica em carnes e produtos cárneos. As mudanças nos valores de TBARS foram acompanhadas durante todo o período de fabricação do salame (Figura 5).

No início da fabricação, os valores de TBARS dos tratamentos não apresentaram diferença estatística. Entretanto, no 7º dia de fermentação o tratamento T1 apresentou um grande aumento no valor de TBARS diferindo estatisticamente dos outros tratamentos até o final da fabricação. O tratamento T3 também teve uma elevação no valor de TBARS no 14º dia de fabricação, mantendo essa diferença estatística até o final da maturação.

Já os tratamentos T2 e T4, que contém cepas de *Staphylococcus xylosus* isoladas, apresentaram valores de TBARS estatisticamente menores que os outros tratamentos a partir do 14º dia. Barrière et al. (2001) destacam que os *Staphylococcus* apresentam atividade catalase importante na decomposição do peróxido de hidrogênio e para prevenir a oxidação lipídica. Como cita Hammes (1990), os microrganismos isolados de produtos tradicionais são mais promissores

para uso como culturas *starters*, pois se adaptam melhor ao ambiente da carne e são capazes de dominar a microflora dos produtos.



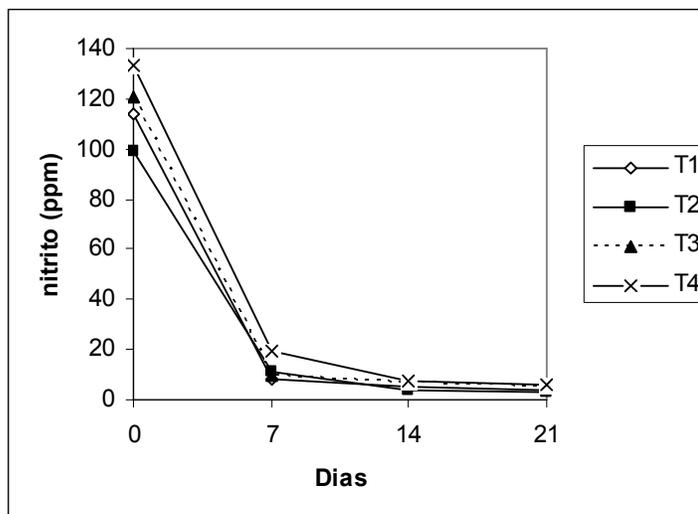
T1: adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2: mistura de *Staphylococcus xylosus* isolados de embutidos artesanais mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3: mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolados de produto lácteo mais *Staphylococcus xylosus* comercial e T4: *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados.

**Figura 4.** Valores médios de TBARS dos salames formulados com diferentes culturas *starters*

Os valores de nitrito estão expostos na Figura 4. Pode-se observar que os valores iniciais de nitrito estavam entre 99,34 e 133,65 ppm, sendo que no 7º dia de fermentação houve uma grande redução em seus valores. No 21º dia de fabricação observa-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos, ficando em em torno de 3,28 e 6,09 ppm.

Estes valores estão de acordo com a Portaria nº 1004 de 11/12/98 do Ministério da Saúde, que permite nível máximo residual de nitrito de 0,015g/100g, ou seja, 150 ppm (BRASIL,1998).

Campbell-Platt & Cook (1995) destacam que menos de 50 mg/Kg de nitrito são suficientes para a obtenção da cor característica de cura para embutidos fermentados. Essa quantidade deve ser atingida antes da queda de pH, provocada pelo crescimento de bactérias lácticas, uma vez que a enzima nitrato redutase bacteriana tem atividade insignificante em valores de pH menores que 5,4.



T1: adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosum* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2: mistura de *Staphylococcus xylosum* isolados de embutidos artesanais mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3: mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolados de produto lácteo mais *Staphylococcus xylosum* comercial e T4: *Staphylococcus xylosum* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados.

**Figura 5.** Valores médios do teor de nitrito dos salames formulados com diferentes culturas *starters*.

Os valores da determinação da cor dos salames durante a fabricação encontram-se na Tabela 2. Os valores de L\* (brilho) diminuíram em todos os tratamentos ao longo dos 21 dias de fabricação. No início da fermentação, o tratamento T1 apresentou uma diferença significativa em relação aos tratamentos T2 e T4. No final da maturação os tratamentos não apresentaram diferença significativa. De acordo com Bozkurt & Bayram (2006) este decréscimo representa a formação da cor escura em decorrência de reações de escurecimento. Semelhantemente, Kayaardi & Gök (2003) verificaram que os valores de L\* de salames geralmente decrescem durante o período de maturação. Casaburi et al. (2007) analisaram a cor de salames elaborados com cepas de *Staphylococcus xylosum* artesanais do sul da Itália e os valores de L\* também decresceram durante 38 dias de análise.

Os valores de a\* (índice de vermelho) aumentaram durante todo o período de fabricação. No início da fermentação, o tratamento T3 apresentou o maior valor (17,42) diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. No final da maturação o tratamento T2 e T3 não apresentaram diferença estatística do tratamento T1, que apresentou o maior valor (22,30) e nem do T4 que apresentou o menor valor (18,48). Durante os primeiros dias de fermentação, o óxido nítrico já presente na carne

combina-se com a mioglobina produzindo a nitrosomioglobina (LUCKE, 1994). Como este pigmento tem coloração vermelha, os valores de  $a^*$  aumentam durante a elaboração do salame.

**Tabela 2.** Valores médios da determinação de cor dos salames formulados com diferentes culturas *starters* expressos como  $L^*$  (brilho),  $a^*$  (índice vermelho) e  $b^*$  (índice amarelo)

Dias	Tratamentos*	$L^*$	$a^*$	$b^*$
0	T1 (controle)	59,02 <sup>a</sup>	12,40 <sup>b</sup>	10,29 <sup>b</sup>
	T2	52,76 <sup>b</sup>	13,00 <sup>b</sup>	9,70 <sup>b</sup>
	T3	55,40 <sup>ab</sup>	17,42 <sup>a</sup>	11,58 <sup>a</sup>
	T4	52,26 <sup>b</sup>	13,82 <sup>b</sup>	9,74 <sup>b</sup>
3	T1 (controle)	56,17 <sup>a</sup>	18,79 <sup>b</sup>	9,52 <sup>b</sup>
	T2	50,41 <sup>b</sup>	17,52 <sup>b</sup>	8,98 <sup>b</sup>
	T3	53,04 <sup>ab</sup>	21,22 <sup>a</sup>	11,02 <sup>a</sup>
	T4	50,23 <sup>b</sup>	17,07 <sup>b</sup>	9,19 <sup>b</sup>
7	T1 (controle)	51,04 <sup>a</sup>	19,75 <sup>ab</sup>	9,13 <sup>b</sup>
	T2	49,34 <sup>ab</sup>	18,39 <sup>b</sup>	8,79 <sup>b</sup>
	T3	48,93 <sup>ab</sup>	21,76 <sup>a</sup>	10,05 <sup>a</sup>
	T4	47,11 <sup>b</sup>	17,40 <sup>b</sup>	7,88 <sup>c</sup>
14	T1 (controle)	49,90 <sup>a</sup>	21,85 <sup>a</sup>	9,06 <sup>ab</sup>
	T2	44,12 <sup>b</sup>	19,80 <sup>b</sup>	7,87 <sup>bc</sup>
	T3	46,71 <sup>ab</sup>	21,74 <sup>a</sup>	9,90 <sup>a</sup>
	T4	46,81 <sup>ab</sup>	17,83 <sup>c</sup>	7,63 <sup>c</sup>
21	T1 (controle)	44,02 <sup>a</sup>	22,30 <sup>a</sup>	7,89 <sup>a</sup>
	T2	41,51 <sup>a</sup>	19,88 <sup>ab</sup>	7,56 <sup>a</sup>
	T3	44,90 <sup>a</sup>	21,78 <sup>ab</sup>	8,65 <sup>a</sup>
	T4	42,86 <sup>a</sup>	18,48 <sup>b</sup>	7,56 <sup>a</sup>

Médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma coluna, no mesmo dia, não apresentam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. \*T1: adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2: mistura de *Staphylococcus xylosus* isolados de embutidos artesanais mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3: mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolados de produto lácteo mais *Staphylococcus xylosus* comercial e T4: *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados.

Os valores de  $b^*$  (índice de amarelo) diminuíram em todos os tratamentos durante a fabricação, sendo que no início da fermentação foi observada uma diferença significativa do tratamento T3 em relação aos outros tratamentos. No final do período da maturação, os tratamentos não diferiram estatisticamente. Estes

resultados concordam com os dados obtidos por Perez-Alvarez et al. (1999), que observaram a diminuição dos valores de  $b^*$  de salames durante a fermentação e maturação, atribuindo este decréscimo ao consumo de oxigênio pelos microrganismos, e a conseqüente diminuição da oximioglobina, a qual contribui para a coloração amarela.

### 3.3 Análise sensorial

Os valores médios para os quesitos de cor, odor, sabor e textura encontram-se na Tabela 3. Em relação à cor apenas o tratamento T4 diferiu estatisticamente do tratamento T1 (controle) representado na escala como regularmente melhor que o padrão. Nos atributos odor e sabor, o tratamento T4 também diferiu estatisticamente do tratamento T1, enquanto que o tratamento T3 não diferiu dos outros tratamentos. Em relação à textura não foi observada diferença estatística entre os tratamentos. De modo geral, o tratamento T4 elaborado com culturas *starters* nativas apresentou melhores resultados que os salames elaborados com culturas *starters* comerciais em todos os quesitos analisados.

**Tabela 3.** Valores médios de notas para cor, odor, sabor e textura dos salames

	Cor	Odor	Sabor	Textura
T1 (controle)	4,0 <sup>b</sup>	4,0 <sup>b</sup>	4,1 <sup>b</sup>	4,0 <sup>a</sup>
T2	3,6 <sup>b</sup>	4,3 <sup>b</sup>	4,4 <sup>b</sup>	4,3 <sup>a</sup>
T3	4,3 <sup>b</sup>	4,5 <sup>ab</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	4,7 <sup>a</sup>
T4	5,2 <sup>a</sup>	5,2 <sup>a</sup>	5,5 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>

Médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Dunnett. \*T1: adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2: mistura de *Staphylococcus xylosus* isolados de embutidos artesanais mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3: mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolados de produto lácteo mais *Staphylococcus xylosus* comercial e T4: *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados.

## 4. CONCLUSÃO

Em relação as análises microbiológicas realizadas nos salames, a contagem da família *Micrococcaceae* e *Staphylococcus xylosus* o tratamento T1 (controle) apresentou valores menores que os outros tratamentos. Já a contagem de bactérias ácido lácticas, coliformes totais e fecais os tratamentos não apresentaram diferença estatística do controle.

Os salames elaborados com diferentes culturas *starters*, apresentaram uma queda de pH significativa e também uma redução na atividade de água, garantindo uma segurança microbiológica aos produtos.

Em relação à oxidação lipídica, os tratamentos que continham cepas de *Staphylococcus xylosus* isolados de salames artesanais apresentaram valores menores que os outros tratamentos.

Já análises de perda de peso, nitrito e os valores de cor L\* e b\* não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, apenas o valor de a\* o tratamento T1 (controle) apresentou valor maior diferindo estatisticamente do tratamento T4.

Os salames elaborados com *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados apresentaram melhores resultados sensoriais quando comparados com salames elaborados com culturas *starters* comerciais.

Portanto, a adição de culturas *starters* nativas pode ser utilizada na elaboração de salames, proporcionando produtos seguros e com *flavor* diferenciado.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSIADIS, J.; SOULTOS, N.; ABRAHIM, A.; BLOUKAS, J. G. Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. **Meat Science**, v. 66, p. 279-287, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC internacional**. 16. ed. v.2, 1996.

BARRIÈRE, C. ; CENTENO, D.; LEBERT, A. LEROY-SÉTRIN, S. BERDAGUÉ, J. L. TALON, R. Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, p. 181-185, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Regulamento Técnico Atribuição de Funções de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos. Portaria nº 1004, 11/12/98, Diário Oficial da União, de 14/12/98. Brasília. Ministério da Saúde, 1998.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Cárneos. Instruções Normativas nº 22, de 31/07/2000, **Diário Oficial da União**, de 03/08/2000. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2000.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. – **Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003.

BOZKURT, H.; BAYRAM, M. Colour and textural attributes of sucuk during ripening. **Meat Science**, v. 73, n. 2, p. 344-350, 2006.

CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P. E. **Fermented meats**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 242p.

CASABURI, A.; ARISTOY, M. C.; CAVELLA, S.; MONACO, R. D.; ERCOLINI, D.; TOLDRÁ, F.; VILLANI, F. Biochemical and sensory characteristics of tradicional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. **Meat Science**. v. 76, p. 295-307, 2007.

CAVENAGHI, A. D.; OLIVEIRA, M. N. Influência de algumas características físico-químicas e sensoriais na qualidade de salame tipo Italiano fabricado no Brasil. **Revista Nacional da Carne**, v. 23, p. 44-48, 1999.

CHASCO, J.; LIZASO, G.; BERIAIN, M. J. Cured colour development during sausage processing. **Meat Science**, v. 44, n. 3, p. 203-211, 1996.

CIROLINI, A.; FRIES, L. L.M.; TERRA, N. N.; MILANI, L. I. G.; URNAU, D.; SANTOS, B. A.; CERVO, G.D.; BALDISSERA, E.M.; REZER, A.P.S. Isolamento e caracterização de *Staphylococcus xylosus* de salames coloniais. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 7, 2007a, Campinas. **Anais...Campinas**, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007a. CD-ROM.

CIROLINI, A.; FRIES, L. L.M.; TERRA, N. N.; MILANI, L. I. G.; URNAU, D.; SANTOS, B. A.; CERVO, G.D.; REZER, A.P.S.; PADILHA, V.S. *Lactococcus lactis ssp lactis* fermentado em meio de cultura à base de plasma suíno. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 7, 2007b, Campinas. **Anais...** Campinas, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007b. CD-ROM.

COCOLIN, L.; MANZANO, M.; AGGIO, D.; CANTONI, C.; COMI, G. A novel polymerase chain reaction (PCR) - denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of *Micrococcaceae* strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. **Meat Science**. v.57, p.59-64, 2001.

COSTA NETO, P.L.O. Estatística. São Paulo: Edgard Blücher, 1977, 264p.

HAMMES, W. P. Bacterial starter cultures in food production. *Food Biotechnology*, v. 4, p. 383-387, 1990.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; MOSCHONAS, G.; GAITIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v.69, p.307-317, 2005.

DUTCOSKY, S. D.; **Análise Sensorial de Alimentos**. Editora Champagnat, Curitiba, 1996.

ESSID, I.; ISMAIL, H. B.; AHMED, S. B. H.; GREDAMSI, R.; HASSOUNA, M. Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. **Meat Science**. v.77, p.204-212, 2007.

FONTÁN, M. C. G.; LORENZO, J. M.; PARADA, A.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological characteristics of “androlla”, a Spanish traditional pork sausage. **Food Microbiology**. v. 24, p. 52-58, 2007.

GARCIA-VARONA, M.; SANTOS, E. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of Chorizo. **International Journal of Food Microbiology**. v.54, p.189-195, 2000.

GEISEN, R., LUECKE, F. K., KROECKEEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. **Fleischwirtschaft**, v.72, p.898–984, 1992.

GRECO, M., MAZZETTE, R., DE SANTIS, E. P. L.; CORONA, A.; COSSEDDU, A. M. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. **Meat Science**. v.69, p.733–739, 2005.

KAYAARDI, S.; GÖK, V. Effect of replacing beef fat with olive oil on quality characteristics of Turkish soudjouk (sucuk). **Meat Science**, v. 66, n.1, p.249-257, 2003.

LIZASO, G.; CHASCO, J.; BERIAIN, J. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichon, a Spanish dry cured sausage. **Food Microbiology**, v.16, p. 219-228, 1999.

LUCKE, F. K. Fermented meat products. **Food Research International**, v. 27, n.3, p. 299-307, 1994.

LUCKE, F. K. Utilisation of microbes to process and preserve meats. **Meat Science**, v.56, p.105–115, 2000.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**. v. 67, p.149–158, 2004.

MORETTI, V. A.; MADONIA, G.; DIAFERIA, C.; MENTASTI, T.; PALEARI, M. A.; PANSERI, S.; PIRONE, G.; GANDINI, G. Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. **Meat Science**. v.66, p. 845-854, 2004.

PEREZ-ALVAREZ, J. A.; SAYES-BARBARE, M. E.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; ARANDA-CATALA, V. Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. **Food Research International**, v. 32, n. 9, p. 599-607, 1999.

RAHARJO, S., SOFOS, J. N., SCHMIDT, G. R. Improved speed, specificity and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C<sub>18</sub> method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.40, p.2182-2185, 1992.

RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.2, p.255-267, 2006.

REIS, A. G. B.; SOARES, G. J. D. Salame colonial processado com carne suína e ovina. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2, n.2, p. 115-120, 1998.

RUST, R. E. Productos Embutidos. In: PRICE, J. F., SCHWEIGERT, B. S. (Ed) **Ciencia de La Carne y de Productos Carnicos**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1994, p. 415-440.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; VLASSI, M.; PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salmi – a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, p. 69-82, 1998.

SAWITZKI, M. C. **Caracterização de Bactérias Ácidos Láticas isoladas de Salames Artesanais e aplicadas como culturas iniciadoras em Salame Tipo Italiano**, 2000. 53 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de Alimentos**. Brasília. Serviço de produção de informação. EMBRAPA, 1995. 159p.

STAHNKE, L. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels – Part I. Chemical and Bacteriological Data. **Meat Science**, v.41, n.2, p.179-191, 1995.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo:Editora Unisinos, 2003.216p.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e Seus Derivados**. São Paulo:Ed. Nobel. 1988. 121p.

VURAL, H. The use of commercial starter cultures in the production of Turkish semi-dry fermented sausages. **Z. Lebensm Untersforsch A**, v. 207, p.410-412, 1998.

## 4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi realizado o isolamento de cepas de *Staphylococcus xylosus* de salames coloniais da região central do estado do RS. Foram selecionadas 15 cepas a partir de salames coloniais, e estas foram caracterizadas conforme esquema proposto por Holt et al. (1994). Através da morfologia, todas as cepas apresentaram forma de cocos Gram positivos, coagulase negativa e catalase positiva.

Coppola et al. (1997), selecionaram 80 cepas de *Staphylococcus* de salames do sul da Itália, onde 99% destes foram coagulase negativa. Entre os *Staphylococcus* coagulase negativa isolados, 60 cepas foram identificadas como *Staphylococcus xylosus*.

Todas as cepas selecionadas apresentaram crescimento à temperatura de 15°C e 45°C em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e desenvolvimento em concentrações de 10% e 15% de NaCl.

Papamanoli et al. (2002), caracterizando *Micrococcaceae* isolados de salames, testaram o crescimento desses microrganismos na concentração de sal de 10% e 15% em P-ágar e verificaram que a maioria das cepas de *Staphylococcus xylosus* e 50% de *Staphylococcus carnosus* se desenvolveram em alta concentração de sal.

Dados do trabalho de Coppola et al. (1997) testando a capacidade de 58 *Micrococcus* e 73 *Staphylococcus* de crescer com 10% ou 15% de NaCl, demonstrou que 100% das cepas foram capazes de crescer a 10% de NaCl e 70% de *Micrococcus* e 92% de *Staphylococcus* cresceram a 15% de NaCl.

Em um estudo realizado por Essid et al. (2007), testando a habilidade de o *Staphylococcus xylosus* crescer a temperatura de 10, 15 e 20°C em caldo TSB e também suplementado com 10%, 15% e 20% de NaCl, concluíram que todas as cepas cresceram a 10 e 20°C, temperatura usualmente utilizada na fermentação da carne e na presença de 10% e 15% e 20% de sal.

A interação entre sal e temperatura foi negativa para cepas de *S. xylosus*, *S. lentus* e uma cepa de *S. equorum*, em um estudo realizado por Sondergaard & Stahnke (2002), onde concentrações elevadas de sal tiveram um impacto negativo

maior em altas temperaturas do que em temperaturas mais baixas. Essa interação também é mostrada por Sorensen & Jakobsen (1996) onde, aumentando a concentração de sal, decresce o crescimento dos microrganismos, principalmente em alta temperatura e alto pH. Estes autores concluem que as condições em que são fermentados os salames, em geral, não favorecem o crescimento do *Staphylococcus xylosus*.

Neste trabalho, as cepas, após caracterização morfológica, foram posteriormente identificadas pelo *kit* Api Staph (Biomerieux, France).

Este sistema de identificação considerado um método rápido e prático, comporta 20 testes bioquímicos, que após a incubação de 18-24 horas a 35-37°C, as reações são interpretadas e os microrganismos identificados, usando um catálogo analítico ou um programa de identificação (CUNHA et al., 2004).

Um esquema proposto por Kloos and Schleifer (1975) e modificado por Bannerman em 2003 é um método de referência usado para identificação de *Staphylococcus*. Entretanto, este método exige um grande número de testes bioquímicos e necessitam um maior período de incubação (24 a 72 horas), tornando-se de pouca aplicabilidade na rotina dos laboratórios de microbiologia (SILVA et al., 2006).

Cunha et al. (2004) realizaram um estudo para comparar quatro métodos de identificação: o método de referência Kloos and Schleifer modificado por Bannerman, o sistema API STAPH (Biomérieux) e dois métodos modificados do método de referência (método simplificado e método disco), na identificação de 100 cepas. *Staphylococcus xylosus* foi corretamente identificado pelos quatro métodos. O *kit* API STAPH, mesmo não sendo efetivo para algumas cepas como *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, para *Staphylococcus xylosus* apresentou 100% de sensibilidade e especificidade.

Decorrido o tempo exigido de incubação pelo *kit* Api Staph de 24h (35°C - 37°C) efetuou-se a leitura e interpretação dos resultados. *Staphylococcus saprophyticus* foi a espécie mais predominante isolada (80%), seguido pelo *Staphylococcus xylosus* (13,33%) e *Staphylococcus cohnii ssp urealyticus* (6,67%).

Resultados semelhantes foram obtidos por Drosinos et al. (2005), onde *Staphylococcus saprophyticus* foi à espécie dominante (31,1%), seguido por *Staphylococcus xylosus* (19,2%) e *Staphylococcus simulans* (11,4%). Samelis et al. (1998) também encontraram em 4 amostras salames tradicionais Gregos a

predominância de *Staphylococcus saprophyticus*, seguido por *Staphylococcus xylosus*. Resultados similares foram reportados por Papamanoli *et al.* (2002), onde a maioria das cepas foram identificadas como *Staphylococcus saprophyticus* (22%), *Staphylococcus carnosus* (20%) e *Staphylococcus xylosus* (10%).

De acordo com Drosinos *et al.* (2005), as cepas de *Staphylococcus saprophyticus* são oriundas da pele de suínos ou devido à manipulação durante a elaboração do salame, já que esta espécie é prevalentemente encontrada na pele humana e ocasionalmente na pele de animais domésticos.

Samelis *et al.* (1998) reportaram que o *Staphylococcus saprophyticus* deveria ser uma espécie avaliada com potencial para uso como cultura *starter*, mas conforme Hammes & Hertel (1998) esta espécie é reconhecida como um patógeno oportunista e que necessita cuidado. Em um trabalho realizado por Mauriello *et al.* (2004), apenas 2 cepas da espécie apresentam atividade nitrato redutase, a qual seria o primeiro critério para seleção de cepas como culturas *starters* em salames. Entretanto, apresentam altos valores de atividade superóxido dismutase e atividade catalase e que podem prevenir a oxidação lipídica durante a maturação do salame.

Embora *Staphylococcus saprophyticus* seja frequentemente isolado de salames do sul da Europa, não representa a principal espécie isolada de salames fermentados como o *Staphylococcus xylosus* (MAURIELLO *et al.*, 2004).

Como cita Essid *et al.* (2007), *Staphylococcus xylosus* é a espécie mais predominante isolada de salames Italianos e em Chorizo espanhol. Também Fontán *et al.* (2007), em um trabalho realizado com salames de suínos tradicionais da Espanha “Androlla”, a espécie mais isolada entre *Staphylococcus* foi o *Staphylococcus xylosus*.

As cepas de *Staphylococcus xylosus* selecionadas produzem ácido de D-glucose, D-frutose, D-manose, maltose, lactose, D-trehalose, D-manitol, xilitol, xilose, sacarose, N-acetil-glucosamina, mas não produzem ácido de D-melibiose, rafinose,  $\alpha$ -metil-D-glucosídeo, reduz nitratos e nitritos. Produzem acetoína, apresenta fosfatase alcalina e urease, mas não hidrolisa a arginina. Estas características da espécie *Staphylococcus xylosus* estão de acordo com HOLT *et al.* (1994).

Drosinos *et al.* (2005), isolaram cepas de *Staphylococcus xylosus*, que apresentaram características típicas da espécie, tais como redução de nitrato e produção de ácido a partir de xilose e manose, mas não de rafinose. A maioria das cepas também produziu acetoína e sobreviveu até o fim do processo, visto que as

cepas foram isoladas durante a fase final maturação e também mostraram atividade urease.

A redução de nitrato, usualmente é o primeiro critério de seleção para uso como cultura *starter*, devido à contribuição na formação da cor (GARCIA-VARONA et al., 2000).

A atividade nitrato redutase participa no desenvolvimento e estabilidade da cor vermelha em produtos cárneos, pela formação da mioglobina nitrosa, além disso produz nitrito que pode limitar a oxidação lipídica (TALON et al., 1999).

A produção de catalase, nitrato redutase e a redução do oxigênio na superfície do produto, contribuem para a liberação das enzimas proteases e lipases, que auxiliam no desenvolvimento do *flavor*. Várias substâncias aromáticas e ácidos orgânicos são realçados devido a formação de componentes de baixo peso molecular incluindo peptídeos, aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos graxos livres (SIMONOVÁ et al., 2006).

Papamanoli et al. (2002) isolando *Micrococcaceae* de salames fermentados, destacaram que 60% das cepas de *Staphylococcus xylosus* produziram acetoina, contribuindo positivamente para produção de aroma em salames, 50% das cepas apresentaram atividade fosfatase alcalina e 20% N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase. Também todas as cepas de *Staphylococcus xylosus* apresentaram atividade contra *Listeria monocytogenes*.

Samelis et al. (1998), selecionaram cepas de *Staphylococcus xylosus* que produzia ácido a partir de xilose, arabinose e manose e não produzia de rafinose, tinham um pigmento amarelo pálido. Entretanto alguns *Staphylococcus xylosus* atípicos que não usavam xilose, mas eram capazes de catabolizar arabinose.

Neste experimento, também foi verificada através da contagem de células viáveis e densidade óptica, a capacidade de produzir uma cultura *starter* de *Lactococcus lactis ssp lactis* utilizando um meio de cultura produzido de plasma suíno e avaliar sua eficiência em relação ao meio de cultura tradicional (MRS).

Durante a fermentação em meio de cultura a base de plasma suíno a concentração inicial de células viáveis de *Lactococcus lactis ssp lactis* foi de 5,52 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e alcançou seu crescimento máximo no tempo de 27 horas com 8,58 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, vindo posteriormente a decrescer. A densidade óptica apresentou comportamento semelhante, com pico máximo de 0,88.

O final do processo de fermentação foi concluído com 33 horas, quando o pH tornou-se constante em torno de 6,4, não necessitando mais a adição de NaOH 8%.

De acordo com Del Hoyo et al. (2007), a solubilidade mínima obtido do plasma é em torno de pH 6,4. Tsumura *et al.* (2005) acrescentam que neste pH a rede de proteínas são bastante fracas, de modo que sua solubilidade diminui.

Campagnol (2007) desenvolveu um trabalho utilizando plasma suíno para fermentação de *Lactobacillus plantarum*, onde a cepa alcançou seu crescimento máximo no tempo de 30 horas com 9,82 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e densidade óptica de 0,83, vindo posteriormente a decrescer.

Pode-se observar que a fermentação em caldo MRS, a concentração inicial era de 6,75 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e ao final de 6 horas atingiu seu pico máximo de 8,70 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e densidade ótica de 0,81.

Sawitzki (2000) realizou trabalho semelhante multiplicando *Lactococcus lactis ssp lactis* em caldo MRS, onde observou que com 6h de fermentação a cepa obteve uma leitura espectrofotométrica em 0,216 e o pico na contagem de colônias de 8,76 Log UFC.mL<sup>-1</sup>. O pH 4,76 constatado no meio de fermentação sinalizou a fase final do processo de fermentação.

O desenvolvimento da cepa demonstrou como produto de seu metabolismo a formação de ácido, constatado pela redução do pH do meio de fermentação de 6,40 para 5,02, quando atingiu a contagem de colônias de 8,70 Log UFC.mL<sup>-1</sup> em um período de 6 horas e o pH de 4,81 em 9 horas.

De acordo com Mundt (1986), espécies de *Lactococcus lactis* têm pH final de 4,0 a 4,5 em caldo de glucose. Portanto, baseado nestes dados e valores constantes expressos nas últimas 3 horas de leitura, ao final de 9 horas de fermentação, obteve-se a fase final do processo.

Pode-se observar que os valores alcançados pela fermentação em meio de plasma suíno e a multiplicação em caldo MRS, os valores finais foram semelhantes.

Em relação ao custo médio aproximado, para preparar 1,5L de caldo MRS custa em média R\$ 129.03. Por outro lado, para a preparação de 1,5L de plasma suíno tem-se um gasto de R\$ 9.00 aproximadamente. Logo, nessas condições, a utilização do plasma suíno apresenta vantagens sobre o caldo MRS.

Hyun & Shin (1998) desenvolveram um trabalho de comparação da fermentação com caldo MRS e um hidrolizado enzimático de plasma bovino, em cepas de *Lactobacillus sp.* Observaram que o meio de cultura produzido apresentou

crescimento de bactérias ácido lácticas significativamente alto, com crescimento máximo de 9,71 Log UFC. mL<sup>-1</sup> e no caldo MRS de 9,85 Log UFC. mL<sup>-1</sup>. Também destacaram que o custo do caldo MRS comparado com o plasma bovino é mais elevado devido às fontes de nitrogênio complexas que possui.

Um trabalho realizado por Márquez et al. (2005), não encontraram diferença significativa entre a quantidade de proteínas do plasma bovino (7,21%) e do plasma suíno (6,65%), mas encontraram uma diferença no valor de proteína do plasma de aves (3,46%). Dávila et al. (2007) acrescentaram que o sangue suíno é um importante sub-produto da indústria cárnea, ressaltando a composição das proteínas do plasma, a qual possui 50-60% de albumina, 40-50% de globulina e 1 - 3% de fibrinogênio.

Barboza et al. (1997), também realizaram um trabalho onde utilizaram plasma bovino na elaboração de um meio de cultura alternativo ao caldo MRS. Verificaram que o crescimento das bactérias ácido lácticas no meio de cultura produzido foi similar ao crescimento no caldo MRS, além de apresentar um custo extremamente inferior ao meio comercial.

Neste trabalho, também foi realizado a adição de culturas *starters* indígenas na elaboração de salame tipo Italiano e analisado seu desempenho frente a culturas comerciais. As culturas utilizadas foram *Staphylococcus xylosum* anteriormente isolado de salames coloniais e fermentada em ágar Baird Parker e *Lactococcus lactis ssp lactis* previamente isolado de um produto lácteo e fermentado em meio de cultura de plasma suíno. Elaboraram-se quatro partidas de salame, considerando os seguintes tratamentos: T1 - adição de *starters* comerciais (*Staphylococcus xylosum* e *Lactococcus lactis ssp lactis*); T2 - mistura de *Staphylococcus xylosum* isolado de embutidos artesanais mais *Lactococcus lactis ssp lactis* comercial; T3 - mistura de *Lactococcus lactis ssp lactis* isolado de produto lácteo mais *Staphylococcus xylosum* comercial e T4 - *Staphylococcus xylosum* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados. Foi avaliado as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais dos salames.

Em relação às bactérias ácido lácticas, verificou-se que no início da fermentação os tratamentos T1 e T2 apresentaram uma contagem inicial de aproximadamente 7,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, a qual foi significativamente superior aos tratamentos T3 e T4. Observa-se que esta contagem mais elevada encontra-se nos tratamentos inoculados com cultura comercial de *Lactococcus lactis ssp lactis*.

Após o 3º dia de fermentação até o 14º dia de análise, os tratamentos não diferiram estatisticamente, com uma contagem próxima a 8,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, permanecendo praticamente estável até o final da maturação, apenas o tratamento T4 que aos 21 dias apresentou uma queda de aproximadamente um ciclo logarítmico, diferindo estatisticamente do tratamento T2.

Estes resultados estão de acordo com Rantsiou & Cocolin (2006), que afirmam que após três dias de fermentação as bactérias ácido lácticas alcançam uma contagem de 7 - 8 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, permanecendo relativamente sem alterações, em número, durante todo o período de maturação. Esta alta população de bactérias ácida lácticas produz ácido láctico, ácido acético e possivelmente bacteriocinas que vão inibir o crescimento de bactérias patogênicas, especialmente *Staphylococcus aureus* (GEISEN et al., 1992; LUCKE, 2000).

Foi observado que no início da fermentação, a contagem da família *Micrococcaceae* nos tratamentos T2 e T4 inoculados com *starter* de *Staphylococcus xylosus* nativos, o qual pertence a esta família, apresentaram uma contagem de 7,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, significativamente maior que os tratamentos T1 e T3 (6,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>).

No terceiro dia de fermentação verifica-se um decréscimo no desenvolvimento da família *Micrococcaceae* nos tratamentos T1, T2 e T4, permanecendo até o final da maturação, sendo mais destacado no tratamento T1 com valor final de 4,88 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. Provavelmente este decréscimo na contagem de *Micrococaceae* deve-se ao baixamento do pH durante o processo de maturação dos salames.

Estes resultados estão de acordo com Casaburi et al. (2007), que realizaram um trabalho semelhante com o isolamento de cepas de *Staphylococcus xylosus* de salames do Sul da Itália e adição em salame e observaram que a contagem inicial de *Micrococcaceae* foi de 6 a 7 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, sendo que após 5 dias de fermentação houve um decréscimo para 5 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, afetado pela acidificação. Também Lizaso et al. (1999) e Samelis et al. (1998), consideraram que a acidificação é a causa principal da inibição do crescimento de *Micrococcaceae* na maturação de salames.

Já no tratamento T3, observa-se que houve um aumento de um ciclo logarítmico aos 21º dias de maturação. Trabalho realizado por Cocolin et al. (2001)

também demonstrou um constante crescimento da família *Micrococacceae* durante a maturação de salames tipo Italiano.

Em relação à contagem de *Staphylococcus xylosus*, verifica-se que no início da fermentação os tratamentos T2 e T4 inoculados com *Staphylococcus xylosus* nativos apresentaram uma contagem de 6,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, significativamente maior que os tratamentos T1 e T3 (5,0 Log UFC.mL<sup>-1</sup>).

No terceiro dia de fermentação, todos os tratamentos apresentaram uma queda de valores. Stahnke (1995) cita que a sobrevivência de *Staphylococcus xylosus* é reduzida pela sensibilidade ao ácido produzido pelas bactérias ácido lácticas durante a alta temperatura de fermentação.

Essa queda permaneceu até o 21º dia de maturação nos tratamentos T1, T2 e T4, com destaque para o T1 que apresentou uma diferença significativa em relação aos outros tratamentos (4,09 Log UFC.mL<sup>-1</sup>). Já no tratamento T3 observa-se que houve um aumento de um ciclo logaritmo. Fontán et al. (2007) obteve contagem de *Staphylococcus* de 2,36 a 4,74 Log UFC.mL<sup>-1</sup> em salames coletados e analisados com 20 – 30 dias de maturação.

Os valores iniciais de coliformes totais foram baixos, demonstrando uma boa qualidade higiênico-sanitária da matéria-prima. Os coliformes totais foram progressivamente eliminados em todos os tratamentos durante a fabricação. Estes resultados ressaltam a rápida ação inibidora das culturas *starters* frente aos microrganismos indesejáveis. Também podemos observar que durante todo o período de fabricação não foi detectada em nenhum tratamento a presença de coliformes fecais. Em relação à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella*, realizada no início e no final da fabricação do salame, esses microrganismos não foram encontrados em nenhum tratamento.

Em relação ao pH observa-se que durante os primeiros 3 dias de fabricação, houve uma diminuição nos valores de pH em todos tratamentos. Essa queda ocorreu fundamentalmente devido ao acúmulo de ácido láctico, formado pela ação das bactérias ácido lácticas sobre os carboidratos presentes na massa cárnea, o qual irá refletir no efeito protetor contra microrganismos indesejáveis, conversão e estabilização da cor e formação de compostos desejáveis de sabor e aroma (TERRA, 2003).

Nos tratamentos T1, T2 e T4 após os 3 dias de fermentação a queda nos valores de pH permaneceu. No tratamento T1 o decréscimo do pH continuou até o

final da maturação. Enquanto que após o décimo quarto dia de fermentação, os tratamentos T2 e T4 apresentaram uma elevação do pH até final da maturação dos salames. Isto pode ser atribuído à produção de amônia e outros compostos tais como peptídios, aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos graxos provindos da atividade proteolítica (MAURIELLO et al., 2004).

O tratamento T3 nos dias 7 e 14 dias de fermentação apresentou uma elevação do pH, vindo posteriormente a decrescer. Resultados semelhantes foram encontrados por Sawitzki (2000), onde o salame inoculado com *Lactococcus lactis ssp lactis* apresentou no 14° e 21° dias de fabricação um acréscimo nos níveis de pH e após este período o salame inoculado demonstrou redução do pH, evidenciando-se ainda o efeito acidificante.

Nos 4 tratamentos analisados, os valores finais de pH variaram entre 4,87 e 5,48. Estes valores estão de acordo com Ambrosiadis et al. (2004), que destaca que o pH de salames tradicionais varia entre 4,67 a 6,09.

A atividade de água (Aa) diminuiu em todos os tratamentos durante o processamento. Esta redução pode ser atribuída ao decréscimo nos valores de pH, pois a capacidade de retenção de água das proteínas da carne é diminuída quando o pH se aproxima do seu ponto isoelétrico, acelerando a desidratação e consequentemente a diminuição da Aa (CHASCO et al., 1996).

O tratamento T4 apresentou atividade de água significativamente menor que os demais tratamentos no final do processo de fabricação. Os valores finais ficaram entre 0,80 e 0,87, resultados semelhantes expressos por Cavenaghi & Oliveira (1999), onde destacam que os salames tipo Italiano nacionais, a Aa fica em torno de 0,816 e 0,868.

A média da perda de peso ficou em torno de 43,26%. Estando esse valor um pouco acima da faixa de 30 a 40%, considerada ideal para os produtos fermentados secos (RUST, 1994). Valores semelhantes foram encontrados por Garcia et al. (2000), no processamento de salame tipo Italiano, com uma perda de peso da ordem de 44%. Também Reis & Soares (1998) obtiveram valores entre 38,4 a 43,7% em salames coloniais.

O teste de TBARS é o método mais usual para acompanhar a evolução da oxidação lipídica em carnes e produtos cárneos. As mudanças nos valores de TBARS foram acompanhadas durante todo o período de fabricação do salame.

No início da fabricação, os valores de TBARS dos tratamentos não apresentaram diferença estatística. Entretanto no 7° dia de fermentação o tratamento T1 apresentou um grande aumento no valor de TBARS, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos até o final da fabricação. O tratamento T3, no 14° dia de fabricação, também teve uma elevação no valor de TBARS, mantendo essa diferença estatística até o final da maturação dos salames.

Já os tratamentos T2 e T4, que contém cepas de *Staphylococcus xylosus* isoladas, apresentaram valores de TBARS estatisticamente menores que os outros tratamentos a partir do 14° dia. Barrière et al. (2001) destaca que os *Staphylococcus* apresentam atividade catalase importante na decomposição do peróxido de hidrogênio e para prevenir a oxidação lipídica. Como cita Hammes (1990), os microrganismos isolados de produtos tradicionais são mais promissores para uso como culturas *starters*, pois se adaptam melhor ao ambiente da carne e são capazes de dominar a microflora dos produtos.

Em relação ao nitrito, observa-se que os valores iniciais estavam entre 99,34 e 133,65 ppm, sendo que no 7° dia de fermentação houve uma grande redução em seus valores. No 21° dia de fabricação observa-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos, ficando em torno de 3,28 e 6,09 ppm.

Estes valores estão de acordo com a Portaria n° 1004 de 11/12/98 do Ministério da Saúde, que permite nível máximo residual de nitrito de 0,015g/100g, ou seja, 150 ppm (BRASIL, 1998).

Campbell-Platt & Cook (1995), destacam que menos de 50 mg/Kg de nitrito são suficientes para a obtenção da cor característica de cura para embutidos fermentados. Essa quantidade deve ser atingida antes da queda de pH, provocada pelo crescimento de bactérias lácticas, uma vez que a enzima nitrato redutase bacteriana tem atividade insignificante em valores de pH menores que 5,4.

Na determinação da cor dos salames foi verificado que os valores de L\* (brilho) diminuíram em todos os tratamentos ao longo dos 21 dias de fabricação. No início da fermentação o tratamento T1 apresentou uma diferença significativa em relação aos tratamentos T2 e T4. No final da maturação os tratamentos não apresentaram diferença significativa. De acordo com Bozkurt & Bayram (2006) este decréscimo representa a formação da cor escura em decorrência de reações de escurecimento. Semelhantemente, Kayaardi & Gök (2003) verificaram que os valores de L\* de salames geralmente decrescem durante o período de maturação.

Casaburi et al. (2007) analisaram a cor de salames elaborados com cepas de *Staphylococcus xylosus* artesanais do sul da Itália e os valores de L\* também decresceram durante 38 dias de análise.

Os valores de a\* (índice vermelho) aumentaram durante todo o período de fabricação. No início da fermentação o tratamento T3 apresentou o maior valor (17,42), diferindo estatisticamente dos outros tratamentos. No final da maturação o tratamento T2 e T3 não apresentaram diferença estatística do tratamento T1, que apresentou o maior valor (22,30) e nem do T4, que apresentou o menor valor (18,48). Durante os primeiros dias de fermentação, o óxido nítrico já presente na carne combina-se com a mioglobina produzindo a nitrosomioglobina (LUCKE, 1994). Como este pigmento tem coloração vermelha, os valores de a\* aumentam durante a elaboração do salame.

Os valores de b\* (índice amarelo) diminuíram em todos os tratamentos durante a fabricação, sendo que no início da fermentação foi observada uma diferença significativa do tratamento T3 em relação aos outros tratamentos. No final do período da maturação, os tratamentos não diferiram estatisticamente. Estes resultados concordam com os dados obtidos por Perez-Alvarez et al. (1999), que observaram a diminuição dos valores de b\* de salames durante a fermentação e maturação, atribuindo este decréscimo ao consumo de oxigênio pelos microrganismos e a conseqüente diminuição da oximioglobina, a qual contribui para a coloração amarela.

Na análise sensorial foi observado que em relação à cor apenas o tratamento T4 diferiu estatisticamente do tratamento T1 (controle), representado na escala como regularmente melhor que o padrão. Quanto aos atributos odor e sabor, o tratamento T4 também diferiu estatisticamente do tratamento T1, enquanto que o tratamento T3, não diferiu dos outros tratamentos. Em relação à textura, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos. De modo geral, o tratamento T4 elaborado com culturas *starters* nativas apresentou melhores resultados que os salames elaborados com culturas *starters* comerciais em todos os quesitos analisados.

## 5 CONCLUSÃO

Considerando o presente estudo concluiu-se que das 15 cepas isoladas da microbiota natural de salames coloniais da região central do RS, 2 cepas foram identificadas como *Staphylococcus xylosus*.

O meio de cultura de plasma suíno foi eficiente na multiplicação de *Lactococcus lactis ssp lactis* e apresentou um desempenho semelhante à fermentação do meio de cultura comercial (MRS). Desta forma torna-se uma alternativa para a multiplicação de bactérias ácido lácticas, além de contribuir para diminuir problemas ambientais.

Em relação as análises microbiológicas realizadas nos salames, a contagem da família *Micrococcaceae* e *Staphylococcus xylosus* o tratamento T1 (controle) apresentou valores menores que os outros tratamentos. Já a contagem de bactérias ácido lácticas, coliformes totais e fecais os tratamentos não apresentaram diferença estatística do controle.

Os salames elaborados com diferentes culturas *starters*, apresentaram uma queda de pH significativa e também uma redução na atividade de água, garantindo uma segurança microbiológica aos produtos.

Em relação à oxidação lipídica, os tratamentos que continham cepas de *Staphylococcus xylosus* isolados de salames artesanais apresentaram valores menores que os outros tratamentos.

Já análises de perda de peso, nitrito e os valores de cor L\* e b\* não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos, apenas o valor de a\* o tratamento T1 (controle) apresentou valor maior diferindo estatisticamente do tratamento T4.

Os salames elaborados com *Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis ssp lactis* ambos isolados apresentaram melhores resultados sensoriais quando comparados com salames elaborados com culturas *starters* comerciais.

Portanto, a adição de culturas *starters* nativas pode ser utilizada na elaboração de salames, proporcionando produtos seguros e com *flavor* diferenciado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRREZÁBAL, M. M.; MATEO, J.; DOMINGUEZ, M. C.; ZUMALACÁRREGUI, J. M. The effect of paprika, garlic and salt in rancidity in dry sausages. **Meat Science**, v.54, p.77-81, 2000.

AMBROSIADIS, J.; SOULTOS, N.; ABRAHIM, A.; BLOUKAS, J. G. Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. **Meat Science**, v. 66, p. 279-287, 2004.

ANTONI, I. **Desenvolvimento de um embutido fermentado de carne de peru pelo método de QFD (Quality function Deployment)**, 1998. 110 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, SP.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC international**. 16. ed. v.2, 1996.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.3, 1999.

BARBOZA, Y; MÁRQUEZ, E; GÓMEZ, O; RANGEL, L. Development of a Bovine Plasma Medium for Propagation of Lactobacilli. **Journal of Food Science Technology**, v.34, n. 2, p. 261-263, 1997.

BARRIÈRE, C. ; CENTENO, D.; LEBERT, A. LEROY-SÉTRIN, S. BERDAGUÉ, J. L. TALON, R. Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosum* in the inhibition of linoleic acid oxidation. **FEMS Microbiology Letters**, v.201, p. 181-185, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Regulamento Técnico Atribuição de Funções de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Carnéos. Portaria nº 1004, 11/12/98, Diário Oficial da União, de 14/12/98. Brasília. Ministério da Saúde, 1998.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Carnéos. Instruções Normativas nº 22, de 31/07/2000, **Diário Oficial da União**, de 03/08/2000. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2000.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. – **Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003.

BOZKURT, H.; BAYRAM, M. Colour and textural attributes of sucuk during ripening. **Meat Science**, v. 73, n.2, p.344-350, 2006.

BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.253-272, 1993.

CAMPAGNOL, P. C. **Cultura starter produzida em meio de cultura de plasma suíno e antioxidante natural na elaboração de salame**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P. E. **Fermented meats**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 242p.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 50, p.131-149, 1999.

CARIONI, F. O.; PORTO, A. C. S.; PADILHA, J. C. F.; SANT'ANNA, E. S. Uso de culturas iniciadoras para a elaboração de um embutido à base de carne de pato (*Cairina moschata*). **Ciência e Tecnologia e Alimentos**. v.21, n.3, 2001.

CASABURI, A.; ARISTOY, M. C.; CAVELLA, S.; MONACO, R. D.; ERCOLINI, D.; TOLDRÁ, F.; VILLANI, F. Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. **Meat Science**. v.76, p.295-307, 2007.

CAVENAGHI, A. D.; OLIVEIRA, M. N. Influência de algumas características físico-químicas e sensoriais na qualidade de salame tipo Italiano fabricado no Brasil. **Revista Nacional da Carne**, v. 23, p. 44-48, 1999.

CENCI-GOGA, B.T.; RANUCCI, D.; MIRAGLIA, D.; CIOFFI, A. Use of starter culture of dairy origin in the production of Salame nostrano, an Italian dry-cured sausage **Meat Science**, v.78, n.4, p. 381-390, 2007.

CHASCO, J.; LIZASO, G.; BERIAIN, M. J. Cured colour development during sausage processing. **Meat Science**, v. 44, n. 3, p. 203-211, 1996.

CIROLINI, A.; FRIES, L. L.M.; TERRA, N. N.; MILANI, L. I. G.; URNAU, D.; SANTOS, B. A.; REZER, A.P.S.; PADILHA, V.S.; TREVISAN, A. P. Isolamento de *Lactobacillus* com propriedades probióticas. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 7, 2007, Campinas. **Anais...Campinas**, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007. CD-ROM.

CIROLINI, A.; FRIES, L. L.M.; TERRA, N. N.; MILANI, L. I. G.; URNAU, D.; SANTOS, B. A.; CERVO, G.D.; BALDISSERA, E.M.; REZER, A.P.S. Isolamento e caracterização de *Staphylococcus xylosus* de salames coloniais. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 7, 2007a, Campinas. **Anais...Campinas**, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007a. CD-ROM.

CIROLINI, A.; FRIES, L. L.M.; TERRA, N. N.; MILANI, L. I. G.; URNAU, D.; SANTOS, B. A.; CERVO, G.D.; REZER, A.P.S.; PADILHA, V.S. *Lactococcus lactis ssp lactis* fermentado em meio de cultura à base de plasma suíno. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 7, 2007b, Campinas. **Anais...Campinas**, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007b. CD-ROM.

COCOLIN, L.; MANZANO, M.; AGGIO, D.; CANTONI, C.; COMI, G. A novel polymerase chain reaction (PCR) - denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of *Micrococcaceae* strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. **Meat Science**. v.57, p.59-64, 2001.

COELHO, H. S.; SANTANNA, A. M.; TERRA, N. N.; MORANDINI, L. M. B. Características físico-químicas do salame tipo Italiano contendo couro suíno cozido. **Revista Nacional da carne**, v. 24, n.278, p.84-96, 2000.

COPPOLA, R.; IORIZZO, M.; SAOTTA, R.; SORRENTINO, E.; GRAZIA, L. Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. **Food Microbiology**, v. 14, p.47-53, 1997.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Bluches, 1977, 264p.

CUNHA, M. L.; SINZATO, Y. K.; SILVEIRA, L. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v.99, n.8, 2004.

DÁVILA, E.; PARÉS, D.; CUVELIER, G.; RELKIN, P. Heat-induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. **Meat Science**. v.76, p.216-225, 2007.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHAPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol.**, v.23, p.130-135, 1960.

DEL HOYO, P.; RENDUELES, M. DÍAZ, M. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. **Meat Science**. v.78, n.4, p.522-528, 2007.

DEL HOYO, P.; MOURE, F.; RENDUELES, M. DÍAZ, M. Demineralization of animal blood plasma by ion Exchange and ultrafiltration. **Meat Science**, v. 76, p.402-410, 2007.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; MOSCHONAS, G.; GAITIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v.69, p.307-317, 2005.

DUTCOSKY, S.D.; **Análise Sensorial de Alimentos**. Editora Champagnat, Curitiba, 1996.

ESSID, I.; ISMAIL, H. B.; AHMED, S. B. H.; GREDAMSI, R.; HASSOUNA, M. Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. **Meat Science**. v.77, p.204-212, 2007.

FERNÁNDEZ, M.; ORDÓNEZ, J. A.; BRUNA, J. M.; HERRANZ, B.; HOZ, L. Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Food Science & Technology**. v.11, p.201-209, 2000.

FIORENTINI, A. M.; SAWITZKI, M. C.; BERTOL, T. M.; SANT'ANNA, E. S. Linhagens de *Staphylococcus xylosus* com potencial tecnológico para aplicação em embutidos cárneos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 20, 2006, Curitiba. **Anais...**Curitiba: Tec Art, 2006. 1 CD-ROM.

FONTÁN, M. C. G.; LORENZO, J. M.; PARADA, A.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological characteristics of "androlla", a Spanish tradicional pork sausage. **Food Microbiology**. v. 24, p. 52-58, 2007.

GALLI, F. Os embutidos: como fabricá-los. **Revista Nacional da Carne**, v. 17, n. 194, p.14-27, 1993.

GARCIA-VARONA, M.; SANTOS, E. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from different varieties of Chorizo. **International Journal of Food Microbiology**. v.54, p.189-195, 2000.

GARDINI, F.; MARTUSCELLI, M.; CRUDELE, M. C.; PAPARELLA, A.; SUZZI, G. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. **Meat Science**. v.61, p.275–283, 2002.

GEISEN, R.; FRIEDRICH, L. K.; KROCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. **Fleischwirtschaft**, v.72, p.894-898, 1992.

GRECO, M., MAZZETTE, R., DE SANTIS, E. P. L.; CORONA, A.; COSSEDDU, A. M. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. **Meat Science**. v.69, p.733–739, 2005.

HAMMES, W. P. Bacterial starter cultures in food production. **Food Biotechnology**, v. 4, p. 383-387, 1990.

HAMMES, W. P.; KNAUF, H. J. Starters in the processing of meat products. **Meat Science**, v.36, p.155-168, 1994.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Science**, v. 49, p.125-138, 1998.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3 ed. Editora Academic Press, California, 1998.

HOLT, J. G; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. USA, 1994.

HYUN, C. K.; SHIN, H. K. Utilization of bovine blood plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n.1, p.34-37, 1998.

IACUMIN, L.; COMI, G.; CANTONI, C.; COCOLIN, L. Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from naturally fermented Italian

sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. **Meat Science**. v. 74, p. 281-288, 2006.

IACUMIN, L.; COMI, G., CANTONI, C.; COCOLIN, L. Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p. 480-486, 2006.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed, Porto Alegre:Artmed, 2005. 711p.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de los Alimentos**. 3 ed. Zaragoza (España): Acríbia, 1994.

KAYAARDI, S.; GÖK, V. Effect of replacing beef fat with olive oil on quality characteristics of Turkish soudjouk (sucuk). **Meat Science**, v. 66, n.1, p.249-257, 2003.

LAITILA, A.; SAARELA, M.; KIRK, L.; SIIKA-AHO, M.; HAIKARA, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VIRKAJÄRVI, I. Malt sprout extract medium for cultivation of *Lactobacillus plantarum* protective cultures. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n.4, p.336-340, 2004.

LIZASO, G.; CHASCO, J.; BERIAIN, J. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichon, a Spanish dry cured sausage. **Food Microbiology**, v.16, p. 219-228, 1999.

LUCKE, F. K. Fermented meat products. **Food Research International**, v. 27, n.3, p. 299-307, 1994.

LUCKE, F. K. Fermented sausages. In: Wood B. J. B. (Org). **Microbiology of fermented foods**. 2 nd ed, London: Blackie Academy Professional, v.2, p.441-483, 1998.

LUCKE, F. K. Utilisation of microbes to process and preserve meats. **Meat Science**, v.56, p.105–115, 2000.

MÁRQUEZ, E.; BRACHO, M.; ARCHILE, A.; RANGEL, L.; BENÍTEZ, B. Proteins isoleucine, lysine and methionine content of bovine, porcine and poultry blood and their fractions. **Food Chemistry**, v. 93, n.3, p. 503-505, 2005.

MARTUSCELLI, M.; CRUDELE, M. A.; GARDINI, F.; SUZZI, G. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. **Applied Microbiology**, v.31, p.228-232, 2000.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**. v. 67, p.149–158, 2004.

MORETTI, V. A.; MADONIA, G.; DIAFERIA, C.; MENTASTI, T.; PALEARI, M. A.; PANSERI, S.; PIRONE, G.; GANDINI, G. Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. **Meat Science**. v.66, p. 845-854, 2004.

MOURE, F.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography. **Meat Science**, v. 64, p. 391-398, 2003.

MÜLHER, W. D. curing and smoking are they healthier processes today than they used to be? **Fleischwirtschaft**, v. 71, n1, p. 61-65, 1991.

MUNDT, J. O. Lactic Acid Streptococci. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.2, 1986.

NASSU, R. T., **Utilização de carne de caprinos no processamento de embutido fermentado, tipo salame**, 1999. 154 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, SP.

NOONPAKDEE, W.; SANTIVARANGKNA, C.; JUMRIANGRIT, P.; SONOMOTO, K.; PANYIM, S. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nam*, a traditional Thai fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.137– 145, 2003.

OLIVEIRA, M. S. **Utilização de carne mecanicamente separada (CMS) na produção de salame cozido**. 1999. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

ORDÓÑEZ, J. A.; CAMBERO, M. I.; FERNÁNDEZ, L.; GRACÍA, M. L.; HOZ, G. G. L.; SELGAS, D. **Tecnología de los Alimentos**. V.2. Madrid: Síntesis, 1998. 366p.

ORDÓÑEZ, J. A. P.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de Alimentos: Alimentos de Origen Animal. V.2.** Porto Alegre: Artmed, 2005. 279p.

PAPAMANOLI, E.; KOTZEKIDOU, P.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage. **Food Microbiology**, v. 19, p.441-449, 2002.

PARAMITHIOTIS, S.; MELISSARI, I., DROSINOS, E. H. In vitro assessment of properties associated with the survival through the gastro-intestinal tract of staphylococci isolated from traditional sausage fermentation. **Food Microbiology**. v. 23, p.663-671, 2006.

PEREZ-ALVAREZ, J. A.; SAYES-BARBARE, M. E.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; ARANDA-CATALA, V. Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. **Food Research International**, v. 32, n. 9, p. 599-607, 1999.

PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; HEINEMANN, R. J. B. Bactérias envolvidas no processamento de produtos cárneos – uma revisão. **Bol. SBCTA**. v.35(1/2), p.109-116, 2001.

RAHARJO, S., SOFOS, J. N., SCHMIDT, G. R. Improved speed, specificity and limit of determination of the aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C<sub>18</sub> method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.40, p.2182-2185, 1992.

RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, n.2, p.255-267, 2006.

REIS, A. G. B.; SOARES, G. J. D. Salame colonial processado com carne suína e ovina. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2, n.2, p.115-120, 1998.

RÖDEL, W.; STIEBING, A. Continuous measurement of the ripening pattern of dry sausage. **Fleischwirtschaft**, v. 68, p.1423-1426, 1998.

ROSS, R. P., MORGAN, S., HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**. v. 79, p.3-16, 2002.

RUST, R. E. Productos Embutidos. In: PRICE, J. F., SCHWEIGERT, B. S. (Ed) **Ciencia de La Carne y de Productos Carnicos**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1994, p. 415-440.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; VLASSI, M.; PAPPA, A. Stability and safety of traditional Greek salmi – a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, p. 69-82, 1998.

SAWITZKI, M. C. **Caracterização de Bactérias Ácidos Láticas isoladas de Salames Artesanais e aplicadas como culturas iniciadoras em Salame Tipo Italiano**, 2000. 53 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

SCHEID, G. A.; MINIM, V. P. R.; GOMIDE, L. A.; CHAVES, J. B. P.; VANETTI, M. C. D.; MINIM, L. A.; COIMBRA, J. S. R. Avaliação físico-química e sensorial de salame tipo italiano contendo diferentes concentrações de cravo-da-índia (*eugenia caryophyllus*). **Ciênc. agrotec.**, Edição Especial, p.1576-1583, 2003.

SILVA, C. H. P M.; LINS, A. P.; CRUZ, C. S. O. Avaliação do sistema staph-id para identificação de *Staphylococcus* isolados a partir de espécies clínicos humanos. **RBAC**. v.38, p 7-9, 2006.

SIMONOVÁ, M.; STROMPFOVÁ, V.; MARCINÁKOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; VESTERLUND, S.; MORATALLA, M. L.; BOVER-CID, S.; VIDAL-CAROU, C. Characterization of *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. **Meat Science**. v. 73, p. 559-564, 2006.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de Alimentos**. Brasília. Serviço de produção de informação. EMBRAPA, 1995. 159p

SONDERGAARD, A. K.; STAHNKE, L. H. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus* and *S. equorum* – a comparative study in model systems. **International Journal of Food Microbiology**. v. 75, p.99-109, 2002.

SORENSEN, B. B.; JOKOBSEN, M. The combined effects of environmental conditions related to meat fermentation on growth and lipase production by the starter culture *Staphylococcus xylosum*. **Food Microbiology**, v. 13. p. 265-274, 1996.

STAHNKE, L. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels – Part I. Chemical and Bacteriological Data. **Meat Science**, v.41, n.2, p.179-191, 1995.

TALON, R.; WALTER, D.; CHARTIER, S.; BARBIÉRE, C.; MONTEL, M. C. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.52, p.47-56, 1999

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Editora Unisinos, 2003. 216p.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e Seus Derivados**. São Paulo: Ed. Nobel. 1988. 121p.

TOLONEN, M.; RAJANIEMI, S.; PIHLAVA, J. M.; JOHANSSON, T.; SARIS, P. E.J.; RYHÄNEN, E. L. Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut. **Food Microbiology**. v.21, p.167–179, 2004.

TSUMURA, k.; SAITO, T.; TSUGE, K.; ASHIDA, H.; KUGIMIYA, W.; INOUE, K. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. **Food Science Technology**, v. 38, p.225-261, 2005.

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p.223-244, 2003.

VIANA, F. R.; SILVA, V. D. M.; DELVIVO, F. M.; BIZZOTTO, C. S.; SILVESTRE, M. P. C. Quality of ham patê containing bovine globin and plasma as fat replacers. **Meat Science**, v. 70, p.153-160, 2005.

VILLANI, L.; SANNINO, L.; MOSCHETTI, G.; MAURIELLO, G.; PEPE, O.; AMODIO-COCCHIERI, R.; COPPOLA, S. Partial characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosus*1E and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages. **Food Microbiology**, v. 14, p.555-566,1997.

VURAL, H. The use of commercial starter cultures in the production of Turkish semi-dry fermented sausages. **Z. Lebensm Untersforsch A**, v. 207, p.410-412, 1998.

YAMADA, E. A. A. A produção de salames. **Revista Nacional da Carne**, v.19, n. 220, p. 72-75, 1995.

ZENI, J. S. L. A cor da carne. **Revista Nacional da Carne**. n. 362, p.92-93, 2007.

ZHANG, J. GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 51, n.4, p.407-421, 1999.

ZUBER, A. D.; HORVAT, M. Influence of starter cultures on the free fatty acids during ripening in Tea sausages. **Eur. Food Res. Technol**, v.224, n.4, p.511-517, 2007.