

## ***CAPÍTULO 3***

# **Desenvolvimento de um cultivo iniciador para salames a partir da microbiota natural isolada de salames artesanais**

Teresinha Marisa Bertol  
Angela Maria Fiorentini  
Maristela Cortez Sawitzki  
Jane de Oliveira Peixoto  
José Rodrigo Pandolfi  
Jonas Irineu dos Santos Filho  
Vicky Lilge Kawski  
João Batista Ribeiro  
Evandro Barros



## Introdução

Na produção dos derivados cárneos fermentados, um importante recurso tecnológico é a adição de fermentos cárneos ou cultivos iniciadores à massa do produto, os quais podem promover a qualidade sensorial, microbiológica e físico-química do mesmo. No Brasil, as grandes indústrias de derivados cárneos fermentados já os incorporaram em seus respectivos processos de produção, mas as pequenas ou médias empresas ou os sistemas de agricultura familiar ainda carecem deste recurso. Outra realidade é a de que, para fins industriais, o Brasil importa os fermentos cárneos, os quais têm origem em *habitat* diferente das condições ambientais de produção brasileira e do substrato, o que pode interferir na adaptação e desenvolvimento do microrganismo e nas características sensoriais do produto.

O uso de cultivos iniciadores em embutidos cárneos, geralmente pertencentes ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL) e ao grupo de cocos Gram positivos-catalase positivos (GCC +) da família *Micrococcaceae*, tem proporcionado a obtenção de produtos com boas propriedades sensoriais. A cor, a textura e a qualidade higiênico-sanitária são características influenciadas positivamente pelos cultivos iniciadores. No entanto, as culturas presentes no mercado muitas vezes não realçam suficientemente estas propriedades, com vistas a atender às expectativas de um consumidor cada vez mais exigente. Assim, a seleção de linhagens com boas características para cultivos iniciadores, ou seja, com alto potencial para a produção de aromas, é de fundamental importância para a produção de produtos cárneos fermentados. Além disto, as linhagens com capacidade para produção de ácidos, e conseqüente acidificação do produto, são importantes para a segurança microbiológica dos mesmos. Os microrganismos mais promissores para uso como cultivos iniciadores são aqueles isolados da microbiota natural de produtos tradicionais (microbiota caseira), pois esses microrganismos tendem a ter capacidade metabólica mais significativa, afetando vantajosamente a qualidade do produto. Provavelmente a seleção natural os tenha favorecido, dotando-os de vantagens ecológicas para que possam melhor

competir com os demais microrganismos do alimento.

Os cultivos iniciadores hoje disponíveis comercialmente, na sua maioria, são compostos de mais de um microrganismo, com a finalidade de somar suas ações para obter o efeito desejado no produto final. Dentre as alterações desejáveis promovidas pelos cultivos iniciadores, destacam-se a redução do pH, a produção de catalase, a redução de nitratos e a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, cujas ações promovem a formação de compostos aromáticos típicos de embutidos fermentados, evitam a formação de compostos com odores indesejáveis, reduzem a quantidade de nitrito residual no produto final, e inibem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. No entanto, a aptidão dos mesmos quando aplicados a um tipo particular de embutido é questionável, posto que uma cultura eficiente em um tipo de embutido fermentado não necessariamente tem o mesmo desempenho em outro tipo, frequentemente resultando em perdas de características sensoriais desejáveis.

As mais recentes pesquisas buscam explorar a biodiversidade presente em produtos artesanais na busca de linhagens industrialmente importantes, que possibilitem melhorar e aperfeiçoar o processo de fermentação de embutidos e garantir produtos que, além de melhores características sensoriais, são mais seguros e mais saudáveis. Também é importante garantir um produto com característica regional, identidade cultural e apreciado pelo consumidor. A grande quantidade de embutidos artesanais fermentados de diferentes origens representa um potencial da biodiversidade que pode ser explorado para a obtenção de um cultivo iniciador com características competitivas para dominar o processo fermentativo. Um dos desafios principais é explorar essa biodiversidade e introduzir linhagens que naturalmente dominam as fermentações tradicionais e tendem a ter capacidades metabólicas mais altas.

Diferentes linhagens, tais como *Lactobacillus* e *Staphylococcus*, têm propriedades tecnológicas específicas que podem modificar o resultado da fermentação, bem como a atividade das enzimas de ambos quando utilizados conjuntamente, em comparação com seu uso isoladamente. Desta forma, torna-se importante estudar o efeito sinérgico destas linhagens, pelo seu potencial de alterar a qualidade do produto.

A identificação de microrganismos para uso no desenvolvimento de produtos para alimentação humana utilizando-se somente métodos fenotípicos é insuficiente para a caracterização de um microrganismo, pois não é precisa. Por esta razão, são utilizados métodos moleculares para classificação das cepas e para caracterização e identificação de genes de interesse para o produto em questão. Através do sequenciamento parcial do DNA das amostras é possível comparar as sequências obtidas com os bancos de sequências publicados, de forma a classificar as cepas em estudo quanto ao gênero ao qual pertencem. Além disso, é importante identificar genes relacionados às propriedades tecnológicas de interesse para cultivos iniciadores, tais como atividade de lipase, nitrato redutase, produção de ácido láctico e atividade de bacteriocinas, de forma a melhor explorá-los no futuro.

As cepas de *Lactobacillus plantarum* AJ2 e AL2 e *Staphylococcus xylosus* U5 e AD1 foram parcialmente avaliadas em um projeto anterior (“Desenvolvimento de cultivos iniciadores para o processamento de embutidos cárneos artesanais”), onde foram feitas a caracterização fenotípica e a caracterização molecular das mesmas, bem como o estudo das suas propriedades tecnológicas e a avaliação de cada uma destas cepas isoladamente como cultivos iniciadores em salames do tipo Milano.

## Objetivos

O objetivo deste projeto foi fazer o sequenciamento parcial do DNA das amostras de *L. plantarum* AJ2 e *S. xylosus* U5 visando a identificação de genes relacionados às propriedades tecnológicas de interesse nos cultivos iniciadores, bem como aprofundar as avaliações da expressão das propriedades tecnológicas destas cepas e avaliar o efeito sinérgico de ambas como cultivo iniciador, já que ambas apresentam algumas propriedades complementares importantes em cultivos iniciadores para salames.

## Resultados

### **Caracterização genética de cepas de *L. plantarum* e *S. xylosus***

#### **Amplificação e sequenciamento do rDNA 16S de duas cepas de *Staphylococcus xylosus* e cinco cepas de *Lactobacillus plantarum***

Foi feito o sequenciamento do rDNA 16S das bactérias e as sequências de rDNA foram analisadas, comparando-as com o banco de sequências, buscando sequências específicas (Figuras 1 e 2). Foram obtidas sequências de boa a ótima qualidade, tendo sido possível a montagem (*assembly*) de *contigs* de 1500 pb para as linhagens U5 e AD1 de *S. xylosus* e para a linhagem AJ2 de *L. plantarum*. Para a montagem do *contig* do rDNA da linhagem AL2 de *L. plantarum* falta a realização de uma reação de sequenciamento utilizando o *primer* V3.

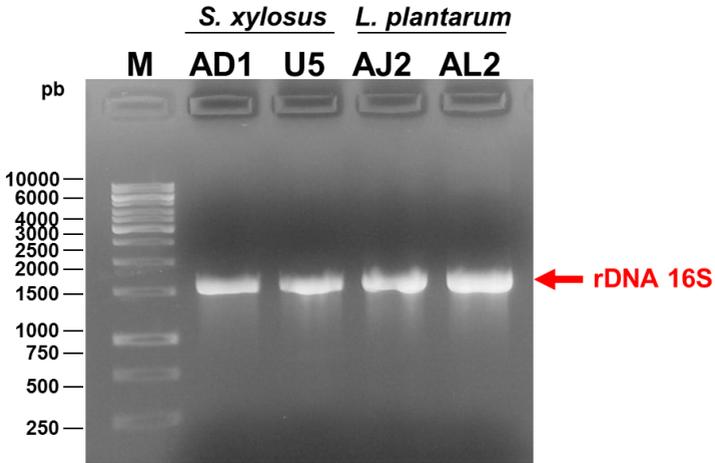


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos amplicons obtidos por amplificação, por PCR, da região do rDNA de *S. xylosum* e *L. plantarum* com os primers rD1 e fD1. M: marcador 1Kb ladder

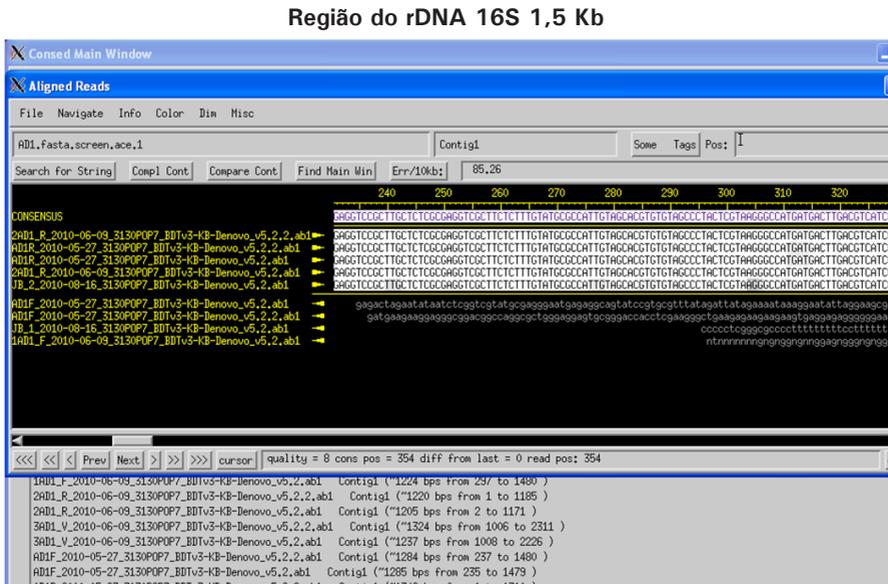


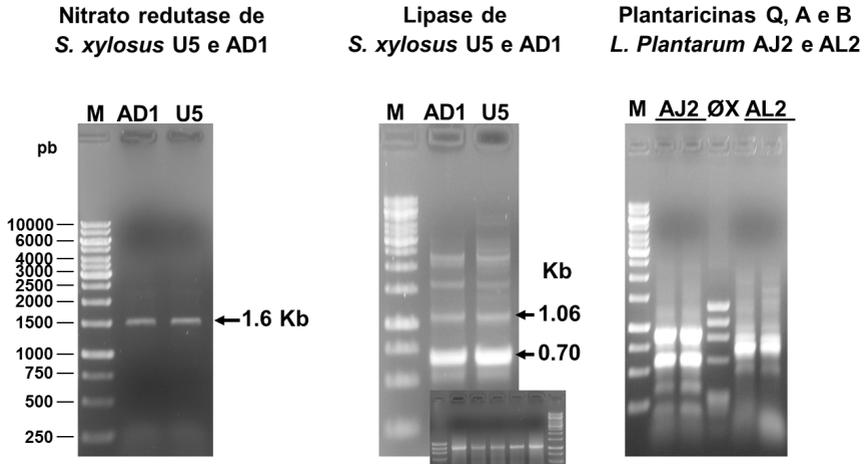
Figura 2. Sequenciamento do rDNA 16S de *S. xylosum* e *L. plantarum*

## Clonagem e sequenciamento de genes de interesse quanto às propriedades tecnológicas importantes para uso como cultivos iniciadores

Foram adquiridos os *primers* listados na Tabela 1, os quais foram testados em diversas condições de amplificação sendo obtidos *amplicons* inespecíficos que foram purificados em colunas GFX a partir do gel de agarose para posterior clonagem. Apenas para os genes de Nitrato redutase de *S. xylosus* U5 e AD1 foram obtidos *amplicons* específicos. Os oligonucleotídeos e os *amplicons* obtidos estão armazenados no freezer do laboratório de genética molecular da Embrapa Suínos e Aves.

**Tabela 1.** *Primers* utilizados para amplificação dos genes de interesse nas cepas *S. xylosus* e *L. plantarum*

Número do <i>primer</i>	Nome do <i>primer</i>	Sequência de nt
1	pbdg.nia.saF	gtcggaggatcacgcaaat
2	pdegania.saR	attgccgcaaatcataacc
3	pbetnia.saR	tccggaagcatagctgttg
4	pdegania.saF	tggcgaacactttggtgata
5	peqnii.saF	tagtaatgcaagctcgaa
6	peqnii.saR	gccgcacctatcaagtaa
7	granii.saF	ggggcatatttatggcaaa
8	granii.saR	ccaattaagggtgtcaattcatc
9	alfnia.saF	gcaatagtcttgggcatttttag
10	alfnia.saR	actcagcacctggacgattt
11	alfniaM.saR	tacgcctgaaatggcttctt
12	1lip856scF	gactgccgcacactattt
13	1lip856scR	tgttctgtatgaggtggggta
14	2lip1135scF	agaggacttggtggcatgag
15	2lip1135scR	tccttgtccatttgggtga
16	3lip1071scF	caaaagaggatcggtgttca
17	3lip1071scR	cattgttttaacgttgagca
18	4lip1295scF	aggagcaagcatgctgaaat
19	4lip1295scR	gcacaccctgcatttctct
20	5lip1608scF	ttcttgcggtgtaccagtca
21	5lip1608scR	aggaacagatgcccactg
22	plantqab2909lpF	tttgaagtgtctgcttgg
23	plantqab2909lpR	taaactctctgcccacca



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos *amplicons* obtidos por amplificação, por PCR, do gene de nitrato redutase de *S. xylosus*, do gene de lipase de *S. xylosus* e dos genes de plantaricinas Q, A e B de *L. plantarum*

### Análise das sequências de rRNA

Para o processo de caracterização, as sequências de rRNA 16S de dois clones de cada cepa foram sequenciados e seus resultados comparados contra o banco RDP database (<http://rdp.cme.msu.edu/>), sendo este um banco específico para caracterização de bactérias usando o marcador 16S. Para cada cepa, dois clones foram sequenciados, sendo eles: "Cepa 1", AJ2 e AL2 de *L. plantarum*; "Cepa 2", U5 e AD1 de *S. xylosus*. As sequências geradas foram depois montadas pelo pacote phred/phrap/consed, e seus resultados são apresentados abaixo. A montagem de 8 *reads* da "Cepa 1" gerou um *Contig* com 1.499 bases e foi classificado pelo banco RDP database como bactérias do gênero *Lactobacillus*, com uma confiança  $\geq 95\%$  como mostra a Figura 4.



RDP HOME | ABOUT | ANNOUNCEMENTS | CITATION | CONTACTS | RE

## RIBOSOMAL DATABASE PROJECT

BROWSERS | CLASSIFIER | LIBCOMPARE | SEQMATCH | PROBE MATCH | TREE BUILDER | PYRO | TAXOMATIC | SEQCART | ASSIGNEN

### Classifier :: Hierarchy View

[\[ start over \]](#) [\[ assignment detail \]](#) [\[ help \]](#)

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.2, March 2010  
 Taxonomical Hierarchy: RDP training set 6, based on nomenclatural taxonomy and Bergey's Manual  
 Query File:  
 Query Submit Date: Mon Jan 02 21:15:10 EST 2012

Display depth:  Confidence threshold:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: #800000;"></div>

Hierarchy View (click a node to make it the root -- click the root to see sequence assignment detail):

norank Root (1 sequences) [\[show assignment detail\]](#)

- >> domain Bacteria (1)
- >>> phylum "Firmicutes" (1)
- >>>> class "Bacilli" (1)
- >>>>> order "Lactobacillales" (1)
- >>>>>> family Lactobacillaceae (1)
- >>>>>>> genus Lactobacillus (1)

**Figura 4.** Classificação da "Cepa 1" pelo site RDP database como bactéria pertencente ao gênero *Lactobacillus*

No estudo de caracterização da "Cepa 2", a montagem de 8 *reads* produziu dois *Contigs* com os respectivos tamanhos, 483 e 413 bases. A montagem do fragmento em apenas um *Contig* não foi possível, pois os *reads* ficaram curtos e com baixa qualidade nas bases finais sequenciadas. Para o processo de caracterização, as sequências dos dois *Contigs* foram submetidas ao banco do RDP, mas não foi possível classificar os microrganismos desta Cepa.

O resultado obtido para a "Cepa 2" não condiz com o esperado para a amostra sequenciada. Posteriormente foi verificado que as amostras utilizadas para sequenciamento estavam contaminadas. Essa espécie apresenta crescimento fastidioso, o que favorece possíveis contaminações durante o processo. Portanto, novas amostras desta cepa serão obtidas, o DNA será amplificado e sequenciado, o fragmento será fechado em uma única sequência consenso e as análises de classificação refeitas para identificar se houve algum problema de manipulação da amostra para o primeiro processo de sequenciamento.

## **Avaliação das propriedades tecnológicas das cepas *L. plantarum* AJ2 e do *S. xylosus* U5**

### **Atividade antagonista**

Efeitos de antagonismo das linhagens *S. xylosus* U5 e AD1 e *L. plantarum* AJ2 e AL2 foram avaliados, seguindo a técnica em gota (*spot on the lawn*) (LEWUS et al., 1991; OKEREKE; MONTVILLE, 1991). Os seguintes microrganismos patogênicos foram submetidos ao teste de antagonismo: *L. monocytogenes* NTC 098630, *E. coli* ATCC 25922, e *S. aureus* ATCC 12598, *Salmonella* sp. Foram detectados efeitos de antagonismo das linhagens *S. xylosus* U5 e AD1 e *L. plantarum* AJ2 e AL2 sobre *L. monocytogenes* (NTC 098630), *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 12598) e *Salmonella* sp. Um halo de inibição formado ao redor do crescimento do microrganismo teste indicou a atividade antagonista das linhagens e o diâmetro do mesmo foi expresso em mm. Posteriormente foi comprovada a natureza proteica da substância inibitória, utilizando-se a enzima quimotripsina.

### **Atividades enzimáticas**

As atividades de catalase, superóxido dismutase, nitrito e nitrato redutase, atividade lipolítica e proteolítica foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por Mauriello et al. (2004). Foi observada atividade de catalase, superóxido dismutase (SOD), nitrato redutase, atividade proteolítica sarcoplásmica e atividade lipolítica das cepas de *S. xylosus* U5 e AD1. Atividades de SOD e de catalase podem ajudar a prevenir *off-flavor* produzido pela oxidação de lipídios durante a maturação de embutidos fermentados. A capacidade de reduzir nitrato (nitrato redutase), observada na espécie U5 é considerada a mais importante característica para selecionar um cultivo iniciador com potencial para aplicação em embutidos cárneos. As cepas de *L. plantarum* apresentaram apenas atividade de SOD e atividade proteolítica, sendo que a linhagem AJ2 mostrou uma pobre capacidade proteolítica, enquanto a linhagem U5 apresentou maior proteólise contra a proteína sarcoplasmática.

## **Avaliação do potencial sinérgico das cepas *L. plantarum* AJ2 e do *S. xylosus* U5 para melhoria da qualidade e segurança do produto**

Foi estabelecida uma parceria com uma empresa do setor cárneo para avaliação das cepas de *S. xylosus* U5 e de *L. plantarum* AJ2 como cultivos iniciadores na produção de salames do tipo Italiano. A empresa disponibilizou suas instalações experimentais para a produção dos embutidos, bem como a sala e o painel para análise sensorial das amostras, porém, devido a problemas inerentes à agroindústria em questão, este estudo foi inviabilizado.

Resultados obtidos em projeto anterior em um estudo de validação em uma agroindústria da região confirmaram o potencial das cepas em estudo, individualmente e em conjunto, para melhorar as características sensoriais e a aceitação do salame tipo Milano pelos consumidores (SAWWITZKI et al., 2008; FIORENTINI et al., 2009).

## **Avaliação econômica do produto e transferência de tecnologia**

Foi feita uma avaliação econômica simplificada do valor total de mercado dos cultivos iniciadores na hipótese do uso do produto em 100% do salame produzido no Brasil.

Os cálculos de consumo foram baseados em dados do consumo domiciliar *percapita* fornecido na Pesquisa de Orçamentos Familiares. Os dados de consumo domiciliar per capita foram extrapolados em um primeiro momento utilizando-se a população brasileira e, em um segundo momento, ampliando-se o consumo em 30% visando incorporar o consumo fora do domicílio. Por fim, os dados de preços foram fornecidos pelo Instituto de Economia Agrícola e contato direto com empresas fornecedoras do insumo.

Com base nos dados utilizados, chegou-se aos seguintes valores:

- Custo das culturas comerciais: R\$ 14,10/sachê para 100 kg de salame.
- Custo da cultura iniciadora no salame: R\$ 0,14/kg.
- Preço do salame: R\$ 37/kg em SP.
- Consumo de salames no Brasil: 29.000 - 37.700 ano.
- Mercado de salames no Brasil: R\$ 1.073.000.000 – R\$ 1.394.000.000\*/ano.
- Mercado potencial das culturas iniciadoras (caso sejam usadas em 100% dos salames): 7.250 – 9.425 kg de culturas iniciadoras/ano (R\$ 4.089.100 - R\$ 5.315.700/ano).

Este valor (R\$ 4.089.100 - R\$ 5.315.700/ano) poderá ser, pelo menos parcialmente, apropriado por empresas nacionais no caso da produção de um cultivo iniciador no Brasil. Este cenário considera somente o uso do cultivo iniciador em salames, porém, há também a possibilidade de seu uso na produção de copa ou outros produtos curados, além do potencial para desenvolvimento de cultivos iniciadores para fabricação de queijos.

Deve-se considerar também que a disponibilidade de produto nacional e de baixo custo irá viabilizar a sua utilização pelos pequenos produtores familiares que, devido a desconhecimento do benefício proporcionado, dificuldade de acesso e alto custo, ainda não utilizam o produto.

## Considerações finais

Devido a problemas alheios à equipe do projeto não foi possível obter resultados conclusivos quanto ao uso simultâneo das cepas em estudo como cultivos iniciadores para salames. Entretanto, em projeto anterior foi demonstrado o potencial de uso das cepas de *S. xylosus* U5 e de *L. plantarum* AJ2 para melhoria da qualidade do salame tipo Milano. Estes resultados, com as propriedades tecnológicas apresentadas por estas cepas e comprovadas neste e em estudos anteriores, indicam seu potencial para o desenvolvimento de um cultivo iniciador para produção de salames.

Ainda que o produto tenha demonstrado viabilidade técnica, a sua viabilidade econômica dependerá do custo de fabricação industrial. Neste custo, um dos itens de maior impacto é o preço do meio de cultura para o crescimento das bactérias. Já foram desenvolvidas formulações para meios de cultura de baixo custo, à base de melão de cana, que podem ser utilizadas em escala comercial, o que diminuirá sensivelmente este valor.

## Referências

FIORENTINI, A. M.; SAWITZKI, M. C.; BERTOL, T. M.; BROD, F. C. A.; PELISSER, M. R.; ARISI, A. C.; SANT'ANNA, E. S. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus*: Technological potential for use in fermented sausage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 3, p. 737-746, 2009.

LEWUS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, D.C, v. 57, n. 6, p. 1683-1688, 1991.

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

OKEREKE, A.; MONTVILLE, T. J. Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 54, n. 5, p. 349-353, 1991.

SAWITZKI, M. C.; FIORENTINI, A. M.; JUNIOR, A. C.; BERTOL, T. M.; SANT'ANNA, E. S. *Lactobacillus plantarum* AJ2 isolated from naturally

fermented sausage and its effects on the technological properties of Milano-type salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 709-717, 2008.

## Literatura recomendada

BOVER-CID, S.; HUGAS, M.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. Amino aciddecarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 66, p. 185–189, 2001.

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

FADDA, S.; VIGNOLO, G.; HOLGADO, A. P. R.; OLIVER, G. Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry-fermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins. **Meat Science**, Champaign, v. 49, p. 1-18, 1998.

GEISEN, R.; LÜCKE, F. K.; KRÖCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. **Fleischwirtsch**, Frankfurter, v. 72, p. 894-898, 1992.

MOLLY, K.; DEMEYER, D.; CIVERA, T.; VERPLAETSE, A. Lipolysis in a Belgian sausage: Relative Importance of Endogenous and Bacterial Enzymes. **Meat Science**, Champaign, v. 43, p. 235–244, 1996.