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

ELABORAÇÃO DE PRODUTO CÁRNEO PROBIÓTICO A PARTIR DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LEITES FERMENTADOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Diala Urnau

Santa Maria, RS, Brasil
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ELABORAÇÃO DE PRODUTO CÁRNEO PROBIÓTICO A PARTIR DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LEITES FERMENTADOS

por

Diala Urnau

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

Orientadora: Profª. Leadir Lucy Martins Fries, PhD

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

ELABORAÇÃO DE PRODUTO CÁRNEO PROBIÓTICO A PARTIR DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LEITES FERMENTADOS

elaborada por
Diala Urnau

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Leadir Lucy Martins Fries, PhD
(Presidente/Orientadora)

_____
Maristela Lovato Flores, Dra. (UFSM)

_____
Ernesto Hashime Kubota, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 25 de fevereiro de 2008.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Carmelise, meu pai Paulo e minha irmã Daila, meus maiores incentivadores, sem o apoio deles não estaria cursando uma pós-graduação.

Ao meu noivo Matheus que esteve sempre ao meu lado, me apoiando em todas as decisões tomadas e ajuda nas horas em que precisei.

À Profª. Dra. Leadir L. M. Fries e o Prof. Dr. Nelcindo N. Terra pela disponibilidade em transmitir seus conhecimentos, pela orientação e pela atenção dada nos momentos mais difíceis.

À minha colega e amiga Andréia Cirolini pela ajuda, companheirismo e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial a Liana I. G. Milani que sempre esteve disposta a ajudar em qualquer hora e qualquer dia. Também à laboratorista Ana Paula Rezer, que contribuiu nas análises de laboratório.

Às bolsistas e amigas Bibiana Alves dos Santos, Vanessa S. Padilha e minha colega Ana Paula Trevisan, que ajudaram em todos os momentos necessários.

Ao Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, em especial Carlos Bianchini, Marialene Manfio, Marta Bianchini e Moisés, pela ajuda e compreensão.

Aos demais colegas, amigos e professores que de certa forma contribuíram para minha aprendizagem e descontração nas horas vagas.

A aqueles que lutam pela manutenção de uma Universidade pública e de qualidade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

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

ELABORAÇÃO DE PRODUTO CÁRNEO PROBIÓTICO A PARTIR DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE LEITES FERMENTADOS

AUTORA: DIALA URNAU
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 como objetivo isolar e caracterizar cepas probióticas de leites fermentados comerciais e multiplica-lás em meio de cultura à base de plasma suíno para inoculação em salames tipo Italiano, juntamente com a cultura *starter Staphylococcus xylosus* isolada de salames artesanais. A contagem das colônias dos leites fermentados foi em meio MRS (De Man Rogosa Sharpe Agar, Oxoid) pela técnica de semeadura em profundidade. As cepas foram isoladas através da técnica 'spread-plate' em meio seletivo, MRS. Cepas individuais foram confirmadas por coloração de Gram e prova da catalase, e identificadas pelos kits Api 20 A e 50 CHL (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France). Após, foram realizados os testes de resistência ao cloreto de sódio adicionado ao ágar MRS, nas concentrações de 1%, 1,5%, 2 %, 2,5% e 3% e resistência ao nitrito e nitrato, que foram realizados pelo mesmo procedimento, nas concentrações de 80, 100, 120, 150 e 200 ppm. Realizou-se também os testes de resistência a bile 0,3% e a acidez, em pH: 3,0, 2,5 e 2,0 de HCl 3M durante 3 e 6 horas. No segundo experimento, a cepa de *Lactococcus lactis ssp lactis 2* isolada foi multiplicada em fermentador para uso como *starter* nos salames. As cepas probióticas foram multiplicadas em placas com meio de plasma suíno acrescido de ágar e o *starter* isolado de *Staphylococcus xylosus* em placas de BAIRD-PARKER. Nos tratamentos foram usados como *starters* o *S. xylosus* e *Lactococcus lactis*, e como cepas probióticas: *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* e *Bifidobacterium spp 2*. O tratamento Controle foi adicionado de *starters* comerciais; o Tratamento 1: com *starters* isolados; Tratamento 2: com *starters* isolados mais adição da cepa probiótica *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* e Tratamento 3: *starters* isolados mais cepa probiótica *Bifidobacterium spp 2*. Foram avaliados os aspectos microbiológicos, físico-químicos e sensoriais. As amostras de leites fermentados analisadas apresentaram contagens superiores a 10^7 UFC·g^{-1} e as cepas encontradas foram: *Actinomyces israelli*, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophylus/jensenii*, *Bifidobacterium spp 2*, *Lactococcus lactis ssp lactis 2* e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1*. As cepas *Bifidobacterium spp 2* e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* foram resistentes a todas as concentrações de cloreto de sódio, nitrito e nitrato, e ao pH de 3,0 durante 3 horas e 6 horas. O *L. paracasei ssp paracasei 1* apresentou contagens inferiores a 10^6 UFC.mL^{-1} em pH 2,0, com 5,63 Log UFC.mL^{-1} em 3 horas de incubação e 3,79 Log UFC.mL^{-1} em 6 horas. A cepa de *Bifidobacterium spp 2* perdeu sua viabilidade probiótica após a exposição de 6 horas nos pH de 2,0 e 2,5, apresentando redução de 9,4 Log UFC.mL^{-1} para 3,67 e 4,18 Log UFC.mL^{-1}, respectivamente. As cepas analisadas apresentaram resistência aos sais biliares, permanecendo em estado viável após 4

horas de exposição à 0,3% de sais biliares. A multiplicação em meio de cultura com plasma suíno alcançou níveis de 5,52 Log UFC.mL^{-1} a 8,58 Log UFC.mL^{-1} e densidade óptica de 0,14 a 0,882, em 27 horas de fermentação. Os parâmetros físico-químicos finais estavam todos de acordo com os padrões de pH e atividade de água, conforme as normas de segurança do produto. Com relação às características sensoriais, as cepas isoladas apresentaram notas estatisticamente iguais e/ou superiores às comerciais e os salames probióticos apresentaram células em estado viável durante 30 dias de armazenamento.

Palavras-chaves: probióticos; culturas *starters*; salame; plasma suíno.

ABSTRACT

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

PROBIOTIC MEAT PRODUCT MADE WITH MICROORGANISMS ISOLATED FROM FERMENTED MILK

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

This study aimed to isolate and characterize probiotic strains from fermented milk and multiplies in the swine plasma medium for inoculation in Italian salamis, with the starter culture *Staphylococcus xylosus* isolated from artisanal salamis. Colonies count of the fermented milks was in the MRS (De Man Rogosa Sharpe Agar, Oxoid) medium by the technique of 'pour-plate'. The strains were isolated through the technical spread plate in selective medium, MRS. Individual strains were confirmed by Gram staining, catalase test and identified by *kits* Api 20 A and 50 CHL (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France). After, passed the tests of resistance to sodium chloride added to the MRS agar, in concentrations of 1%, 1.5%, 2%, 2.5% and 3% and resistance to nitrite and nitrate, which were conducted by the same procedure at concentrations of 80, 100, 120, 150 and 200 ppm. They also passed through of 0.3% bile and acid resistance tests, pH: 3.0, 2.5 and 2.0 of 3M HCl for 3 and 6 hours. In the second experiment, the isolate strain of *Lactococcus lactis ssp lactis 2* passed through multiplication in fermented machine for use as a starter in probiotics dry fermented sausages. The probiotic strains were multiplied in plates with swine plasma medium plus agar and isolate starter *Staphylococcus xylosus* in BAIRD-PARKER plate. In the treatments were used as starters the *S. xylosus* and *Lactococcus lactis*, and as probiotic strains: *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* and *Bifidobacterium spp 2*. Control treatment was added with commercial starters, the Treatment 1: with isolate starters; Treatment 2: with isolate starters adding more probiotic strain a *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* and Treatment 3: starters more probiotic isolate strain *Bifidobacterium spp 2*. Were evaluated microbiological, physic-chemical and sensory aspects. Samples of fermented milks examined showed higher counts to 10^7CFU.g^{-1} and the strains were: *Actinomyces israelli*,

Actinomyces naeslundii, *Lactobacillus acidophylus/jensenii*, *Bifidobacterium spp 2*, *Lactococcus lactis ssp lactis 2* e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1*. The strains *Bifidobacterium spp 2* and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* were resistant to all concentrations of sodium chloride, nitrite and nitrate, and the pH of 3.0 for 3 hours and 6 hours. The *L. paracasei ssp paracasei 1* showed lower counts to 10^6 UFC.mL^{-1} at pH 2.0, with 5.63 Log UFC.mL^{-1} in 3 hours of incubation and 3.79 Log UFC.mL^{-1} in 6 hours. The strain of *Bifidobacterium spp 2* lost its probiotic viability after exposure of 6 hours in the pH of 2.0 and 2.5, showing reduction of 9.4 Log UFC.mL^{-1} to 3.67 and 4.18 Log UFC.mL^{-1}, respectively. The strains analyzed showed resistance to bile salts and remained in a viable state after 4 hours of exposure to 0.3% of bile salts. The propagation in a culture medium made with swine plasma achieved levels of 5.52 Log CFU.mL^{-1} to 8.58 Log CFU.mL^{-1} and optical density of 0.14 to 0.882, in 27 hours of fermentation. All final physical and chemical parameters were up to standards with pHs and activities of water in accordance with the safety standards of the product. Sensory characteristics showed that the isolated strains notes were statistically equal and/or above the commercial strains and probiotics salamis had cells in a viable state for 30 days of storage.

Keywords: probiotics; starter cultures; salamis; swine plasma.

SUMÁRIO

RESUMO.....5

ABSTRACT.....6

1 INTRODUÇÃO.....10

***2* OBJETIVOS**.....11

2.1 Objetivos Gerais.....11

2.2 Objetivos Específicos.....12

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....12

3.1 Probióticos......12

3.2 Salame.....15

3.3 S*tarters*.....18

3.4 Bactérias ácido lácticas x meio de cultura.....20

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....22

4.1 Artigo 1........22

ISOLAMENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS DE LEITES FERMENTADOS COMERCIAIS.....22

4.2 Artigo 2.....34

DRY FERMENTED SAUSAGE MADE WITH ISOLATED PROBIOTIC AND STARTER STRAINS MULTIPLIED IN A CULTURE MEDIUM USING SWINE PLASMA……34

5 DISCUSSÃO.....54

6 CONCLUSÃO.....59

7 SUGESTÕES.....60

REFERÊNCIAS.....61

1 INTRODUÇÃO

Durante as três últimas décadas, tentativas têm sido feitas para melhorar a condição de saúde dos humanos pela modulação da microflora intestinal, usando microrganismos vivos benéficos, chamados probióticos (HOLZAPFEL et al., 1998).

A grande maioria dos produtos probióticos comerciais contém uma ou múltiplas cepas de bactérias ácido lácticas (BALs) pertencendo principalmente aos gêneros *Lactobacillus, Bifidobacterium, Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus* e *Streptococcu*s. (HOLZAPFEL et al., 1998; KLEIN et al., 1998; MERCENIER, 2003). Os alimentos que geram efeitos benéficos à saúde humana, além de seu efeito nutricional, são denominados funcionais. Seu efeito deve-se à adição de ingredientes ativos em sua composição ou à remoção ou substituição de substâncias indesejáveis. Estima-se que o consumo de alimentos funcionais na Europa totalize 5% do consumo total de alimentos (ERKKILÃ et al., 2001b).

No Brasil, o aumento do consumo de iogurte começou em 1970 e continuou com uma taxa excepcional de crescimento devido aos mais variados produtos disponíveis comercialmente, tais como iogurte congelado (*frozen*), o líquido e em forma de bebidas (BRANDÃO, 1987). O interesse da população e da indústria de laticínios em leites fermentados com bifidobactérias probióticas tem aumentado nos últimos anos (KNEIFEL & PACHER, 1993). O leite bífido fermentado tornou-se popular em determinados mercados tais como os Estados Unidos e o Japão. O produto é feito pela incubação prolongada a 37°C de uma ou diversas cepas de *Bifidobacterium* em leite tratado termicamente (MISRA & KUILA, 1992).

As Bifidobactérias são membros predominantes da flora intestinal endógena do ser humano. Estes organismos são utilizados para exercerem efeitos benéficos, incluindo a ativação do sistema imune, a redução do colesterol sérico e a inibição do crescimento dos patógenos potenciais que podem causar infecções no anfitrião (HOLZAPFEL et al., 2001; ISHIBASHI & YAMAZAKI, 2001). Conseqüentemente, a incorporação destas bifidobactérias probióticas nos produtos alimentícios para aumentar o valor terapêutico transformou-se uma tendência popular (BLANCHETTE &

ROY, 1995; FUKUSHIMA et al., 1998; ISHIBASHI & SHIMAMURA, 1993; PESTKA et al., 2001; ROY et al., 1995; TEJADA-SIMON et al., 1999).

A tendência mundial de consumo de alimentos funcionais probióticos e o efeito positivo de sua ingestão diária estimula o estudo de outros tipos de alimentos, aos quais as bactérias benéficas podem ser adicionadas. Neste sentido, a área de carnes mostra-se como uma importante área de aplicação e um grande desafio à incorporação de bactérias lácticas probióticas, visto a sua conhecida sensibilidade ao sal (ANDERSEN, 1998; SAMESHIMA et al., 1998).

Os produtos cárneos fermentados, geralmente, não são aquecidos, assim se tornam adequados para o desenvolvimento de probióticos (HUGAS & MONFORT, 1997; INCZE, 1998). Ainda, as culturas *starters* probióticas da carne que não alteram as propriedades tecnológicas e sensoriais dos produ

- Utilizar a cultura *starter Staphylococcus xylosus* isolada de salames artesanais, nos salames tipo Italiano probióticos.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a sensibilidade dos microrganismos probióticos frente a diferentes concentrações de sais de cura, ao pH e a sais biliares 'in vitro'.
- Verificar a segurança dos salames tipo Italiano adicionado de culturas *starters* frente a microrganismos indesejáveis (coliformes totais e fecais, *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva).
- Determinar as características físico-químicas dos salames tipo Italiano através da determinação de pH, atividade de água, cor e perda de peso.
- Verificar o shelf-life dos salames com culturas probióticas em estado viável (10^6 UFC.g^{-1}).
- Avaliar as características sensoriais do salame tipo Italiano adicionado das culturas probióticas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Probióticos

Inúmeras definições do termo "probiótico" foram usadas ao longo dos anos, mas segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations - World Health Organization (FAO - WHO) e a Associação Científica Internacional para Probióticos e Prébioticos (REID et al., 2003) exemplifica melhor a extensão e o alcance dos probióticos como são conhecidos hoje: "Microrganismos vivos, que quando

administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício a saúde do anfitrião". Os protocolos que estipulam o que é requerido para um produto ser chamado de probiótico foram publicados pela FAO-WHO em 2002.

Considera-se como probióticos, as cepas de microrganismos que possuem a capacidade de resistir a condições ácidas, à ação da bile e lisozima e colonizar o trato intestinal humano, ao menos temporariamente, mediante a adesão às células intestinais. Além dessas características, somam-se outras condições complementares necessárias às culturas probióticas: capacidade de ativação, rápido crescimento e permanência no intestino por um período aceitável, resistência aos antibióticos normalmente, presentes nos alimentos, porém sensibilidade àqueles usados em tratamentos contra bactérias lácticas (penicilinas e aminoglicosídeos) e ausência de propriedades patogênicas, tóxicas, alérgicas, mutagênicas ou carcinogênicas (HUGAS & MONFORT, 1997).

Salminen et al. (1998) têm revisto recentemente as propriedades importantes e os critérios de seleção para os probióticos, bem como fornecer exemplos dos efeitos práticos dos mesmos em infecções intestinais, na manutenção da microflora indígena e, mesmo, no alívio da intolerância da lactose.

As bactérias ácido lácticas são habitantes normais do trato gastrintestinal. O número de bactérias ácido lácticas no estômago é < 3 Log UFC.g^{-1}, no íleo 2 a 5 Log UFC.g^{-1} e no cólon 4 a 9 Log UFC.g^{-1} (GORBACH, NAHAS & LERNER, 1967). Algumas delas, acredita-se funcionar como probióticos.

Os mais comuns dos *Lactobacillus* saudáveis das mucosas orais e retais são *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei subsp. paracasei*, que foram isolados em 52, em 26 e em 17% dos indivíduos, respectivamente (AHRNÉ et al., 1998). Garcia-Lafuente et al. (1999) encontraram um efeito antiinflamatório do *L. paracasei* em um modelo de inflamação de intestino.

A grande maioria dos produtos probióticos comerciais contém uma ou múltiplas cepas das bactérias do ácido láctico (BALs) que pertencem primeiramente aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Além, de outras espécies bacterianas tais como o *Propionibacterium spp*., *Bacillus spp.*, *Escherichia coli* e a levedura "*Saccharomyces boulardii* " (nom.

inval.) foram usados também nos produtos probióticos (HOLZAPFEL et al., 1998; KLEIN et al.,1998; MERCENIER et al., 2003). A seleção e a avaliação de candidatos potenciais a probióticos é um processo múltiplo que focaliza aspectos funcionais, de segurança e tecnológicos (SAARELA et al., 2000; SANDERS & VELD, 1999). Entretanto, devido a maioria das BALs, no geral, ter uma história longa de uso seguro, a avaliação da segurança de probióticos para o uso humano por muito tempo tem sido ignorada ou considerada irrelevante (HUYS et al., 2006).

Gomes & Malcata (1999) enfatizaram que os fabricantes devem observar se os

3.2 Salame

Entende-se por salame o produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho e ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, cru, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado. A presença de mofos característicos na superfície é conseqüência natural do processo de fabricação (BRASIL, 2000b).

Salame é o resultado de mudanças bioquímicas, microbiológicas, físicas e sensoriais que ocorrem em uma mistura de carne durante a maturação sob condições de temperatura e umidade relativa (UR) definidas (CASABURI et al., 2007).

A fabricação de salame ocorre em duas fases: na primeira, há a fermentação com a ocorrência simultânea de acidificação e de formação de cor durante sete dias; a segunda, conhecida como maturação, consiste na desidratação como decorrência da fermentação, por vinte e três dias. Ao final deste período, o embutido deverá apresentar pH entre 5,2 a 5,4 e atividade de água igual a 0,87, caracterizando a finalização do processo. Ambas as fases ocorrem na câmara de maturação sob condições de umidade relativa, temperatura e velocidade do ar controladas (FERNANDEZ et al., 2001).

Segundo Stahnke et al. (2002), os salames podem ser classificados em dois grandes grupos, conforme a tecnologia de fabricação e o pH do produto cárneo. Os salames do Norte da Europa são elaborados com carnes bovina e suína, sendo submetidos a uma fermentação de curto período. Sua principal característica é o sabor picante, causado por valores de pH finais inferiores a 5,0. Já os salames do Mediterrâneo ou do Sul da Europa possuem, em sua formulação, predominantemente carne suína. Sua fermentação é de longo período e os valores de pH são sempre superiores a 5,0, conferindo ao produto aroma e sabor envolventes.

O salame tipo Italiano, fabricado no Brasil, enquadra-se no segundo grupo, pois é predominantemente obtido a partir de carne suína (mínimo de 60%), a maturação é de aproximadamente trinta dias, seu aroma e sabor são suaves e valores de pH estão em torno de 5,4 (TERRA, 1998).

3.2.1 Fabricação do salame

O salame é elaborado utilizando como matéria-prima uma mistura de carne suína, bovina e toucinho. Além disso, contém sal, nitrato e/ou nitrito, ascorbato, açúcar, temperos e outros (BUCKENHÜSKE, 1993).

Na escolha da matéria-prima, prefere-se as carnes mais intensamente coradas de animais de maior idade, sãos, bem nutridos e descansados (PARDI et al., 1996). A coloração vermelho escura do salame constitui um atributo importante de qualidade, devendo a esse fato, o uso de carne bovina nas formulações, visto conter maior teor de mioglobina que a carne suína.

Para evitar problemas no início da fermentação, as carnes utilizadas deverão ter pH normal (5,5-5,8) e um baixo nível de microrganismos indesejáveis, como por exemplo, enterobactérias (LÜCKE, 2000b). A utilização de carnes com pH elevado do tipo DFD (escura, firme e seca) pode prejudicar a diminuição do pH no embutido, favorecendo a multiplicação de bactérias patogênicas e deteriorantes. Por outro lado, o uso de grandes quantidades de carne PSE (pálida, mole e exsudativa) a qual tem baixo pH, pode acarretar em defeitos de dessecação no produto final por uma rápida perda de umidade, além de tornar a cor do produto mais clara que a tradicional (PRÄNDL et al., 1994).

A proporção de carne suína no salame deve ser no mínimo 60%, com exceção do salame hamburguês cujo teor mínimo permitido é de 50%. Além da carne suína, define-se como ingredientes obrigatórios dos salames o toucinho e os sais de cura (sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio). O toucinho a ser empregado deve proceder unicamente de animais depilados (BRASIL, 2000b).

De acordo com a legislação vigente, nos salames também podem ser adicionados ingredientes opcionais, como carne bovina, leite em pó, açúcares, maltodextrinas, proteínas lácteas, aditivos intencionais, vinho, condimentos, aromas, especiarias e substâncias glaceantes para revestimento externo.

3.2.2 Ingredientes

O sal é o principal agente de cura. Atua como conservante pela diminuição da atividade de água do produto, desidratação das bactérias e ação tóxica do íon cloro, sendo também agente flavorizante, contribuindo para o sabor típico do produto curado (CANHOS & DIAS, 1985).

Ingredientes obrigatórios no processo de cura do salame, os nitratos e/ou nitritos adicionados objetivam além da formação de coloração avermelhada, mediante uma cadeia de reações com a mioglobina da carne, a inibição do crescimento de microrganismos patogênicos principalmente *Clostridium botulinum*, a proteção contra oxidação lipídica e a formação de sabor e aroma típico (CANHOS & DIAS, 1985).

O nitrato não possui atividade antioxidante, mas torna-se funcional na redução para nitrito. As funções importantes do nitrito incluem a estabilização da cor, melhoramento da textura, desenvolvimento do *flavor* característico dos produtos curados, eliminação do *flavor* de requentado e atividade antimicrobiana. O nitrito provavelmente funciona como um quelante de metal, podendo formar compostos nitrosos que possuam atividades antioxidantes, além de converter proteínas heme em óxido nítrico estável (JAY, 1994).

Atualmente, busca-se reduzir o tempo de cura dos produtos com a adição direta de nitrito, que reage rapidamente, possibilitando também melhor controle da coloração do produto e da quantidade do nitrito residual (CANHOS & DIAS, 1985). O uso abusivo de nitrito, além de escurecer o produto, poderá causar cianose (TERRA, 1998).

O ascorbato realça a formação da cor, acelerando a redução de nitrito a óxido nítrico (NO) e auxilia a transformação do pigmento metamioglobina e mioglobina nitrosa (PRÄNDL et al., 1994). Possui ação bloqueadora do desenvolvimento de nitrosaminas e influência no sabor e aroma dos produtos cárneos curados. Também, tem como função inibir processos autoxidativos que levam a rancidez (ORDOÑEZ et al., 2005).

Os temperos, tais como a pimenta e o alho, têm como papel principal contribuir para o sabor e aroma típico de embutidos fermentados. Além disso, possuem efeitos antioxidantes, possivelmente, devido à capacidade de quelar metais e também efeitos antimicrobianos (AGUIRREZÁBAL et al., 2000; MILO OHR, 1999).

Os açúcares nos embutidos fermentados, também servem como substrato para a produção de ácidos pelos microrganismos presentes na carne ou pelas culturas adicionadas. O decréscimo de pH exerce influência decisiva sobre a consistência, coloração, aroma e conservação dos salames. Dessa forma, o uso de açúcares contribui para a obtenção de produtos com características sensoriais e estabilidade desejáveis (CANHOS & DIAS, 1985; PRÄNDL et al., 1994).

A variedade e a quantidade de carboidratos adicionados é importante, pois determina a velocidade da multiplicação das bactérias ácido lácticas, já que quanto maior o peso molecular, menor será a velocidade da fermentação. 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 (LÜCKE, 1998).

3.2.3 Procedimento

A carne suína é moída em disco de 12 mm e a carne bovina em disco de 5 mm. O toicinho congelado é refinado até a granulometria desejada com o auxílio do cutter. As carnes moídas são passadas para a misturadeira e incorporados os ingredientes e o toicinho. Após total homogeneização da massa, incorporar o *starter* anteriormente misturado em 200ml de água isenta de cloro (repouso de 30 minutos). Embutir em tripa de colágeno não comestível, calibre de 60mm e colocar as peças de carne em câmara climatizada observando-se a temperatura de 25ºC, umidade relativa de 95% e velocidade do ar de 0,5m/segundo. Baixar diariamente esses valores de modo que ao final de sete dias a temperatura atinja 18°C, umidade relativa de 75% e velocidade do ar inferior a 0,5m/segundo (TERRA,1998).

3.3 *Starters*

De acordo com a definição de Hammes (1996), culturas *starters* cárneas são "preparações que contêm microrganismos vivos ou em estado dormente que

desenvolvem atividade metabólica desejada na carne". Em regra, são cepas heterofermentativas facultativas, que produzem ácido láctico a partir de hexoses, como a glicose e a lactose, como seu único produto metabólico (via glicólise).

A adição de microrganismos desejáveis na carne pode ser realizada com os objetivos de aumentar a segurança microbiológica do produto, melhorar a estabilidade mediante a inibição do crescimento de indesejáveis, melhorar as características sensoriais e promover efeitos benéficos à saúde (LÜCKE, 2000a).

Nas carnes fermentadas, as bactérias lácticas são normalmente empregadas com a finalidade de proporcionar segurança, aumentar a estabilidade e inibir microrganismos indesejáveis, enquanto que as bactérias do tipo cocos catalase positivas, como dos gêneros *Staphylococcus e Kocuria,* leveduras do gênero *Debayromyces* e bolores (*Penicillium*) normalmente proporcionam características sensoriais desejáveis ao produto. Alguns gêneros de leveduras são usados como culturas protetoras, pois dificultam o desenvolvimento de bolores toxigênicos quando inoculadas na superfície dos produtos (LÜCKE, 2000a).

O ácido lático gerado pelas culturas *starters* ácido lácticas durante a fermentação causa uma redução do pH externo, alterando a hemostasia de diferentes patógenos (*Staphylococcus aureus, Clostridium* spp., *Salmonella* spp.) e deteriorantes (*Pseudomonas* e *Enterococcus*). A rápida redução do pH para valores inferiores a 5,3 é suficiente para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* se os produtos forem fermentados acima de 18ºC (JAY, 2005).

A acidificação gera diferentes compostos relacionados ao sabor e aroma. O ácido lático comunica o típico sabor ácido, característico dos produtos cárneos fermentados (TERRA, 1998). Como as bactérias ácido lácticas são em geral, fracamente proteolíticas e lipolíticas, elas influenciam a proteólise e a lipólise principalmente via decréscimo de pH, auxiliando a liberação de enzimas endógenas da carne (ERKKILÄ, 2001).

Os micrococos e estafilococos atuam na coloração, sabor e aroma. Estes últimos obtidos pela ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas que geram peptídeos, aminoácidos e ácidos graxos. Na coloração reduzem o nitrato a nitrito aumentando a disponibilidade de óxido nitroso para reagir com a mioglobina e por possuírem atividade

catalase-positiva, destroem o peróxido de hidrogênio que quando acumulado na carne provoca o aparecimento de coloração esverdeada altamente indesejável. Os microrganismos da família *Micrococcaceae* também consomem oxigênio evitando a rancificação prematura das gorduras (PARDI et al., 1996).

Os *starters* de superfície protegem o produto contra a oxidação, pois dificultam a entrada de oxigênio na peça, facilitam a secagem servindo como tampão nas flutuações do teor de umidade dentro da câmara e desenvolvem modificações desejáveis na aparência e sabor do produto. Dentre as espécies de fungos utilizadas destaca-se o *Penicillium nalgiovense,* muitas vezes empregado em conjunto com a levedura *Debaryomyces hansenii (*LÜCKE, 2000a). Desse modo, as leveduras desempenham ação redutora do sabor ácido no salame por metabolizarem o ácido láctico e tornarem o aroma mais intenso devido a suas propriedades proteolíticas e lipolíticas (TERRA, 1998).

3.4 Bactérias lácticas x meio de cultura

As bactérias lácticas são bactérias Gram positivas, microrganismos anaeróbios facultativos, podendo crescer em presença de oxigênio, porém apresentam melhor desenvolvimento em meio com baixa tensão de oxigênio. São basicamente sacataii o_ão_ã

Nutricionalmente, as bactérias bífidas formam um grupo bastante heterogêneo, necessitando de fatores nutricionais distintos para cada espécie. Entre os fatores nutricionais requeridos estão amino-açúcares, em particular, N-acetil-D-glicosamina; açúcares, como lactulose e oligossacarídeos; vitaminas, como riboflavina, ácido ascórbico, piridoxina, tiamina, biotina; e aminoácidos, como a cisteína, ácido pantotênico e ácido nicotínico (KANDLER & WEISS, 1986; KLAVER et al., 1993).

A multiplicação destas bactérias apresenta como meio de cultura mais utilizado o MRS (de MAN et al., 1960), que é completo para as suas exigências nutricionais. Porém, a principal desvantagem do uso desse meio está em seu elevado custo. Assim, vários meios de cultura para propagação de bactérias ácido lácticas têm sido desenvolvidos nos últimos anos utilizando como fonte de nitrogênio subprodutos da indústria, buscando desta forma, alternativas de baixo custo para a produção destes microrganismos em larga escala (BARBOZA et al., 1997; LAITILA et al., 2004; HORN et al., 2005).

O sangue animal produzido nos matadouros representa o subproduto mais problemático da indústria cárnea (CHERYA, 1986; DORFNER, 1991) devido aos elevados volumes gerados e a sua elevada carga poluente.

O sangue possui duas frações, uma liquida (plasma) e celular (hemáceas). O plasma é composto basicamente das proteínas (7%), da água (91%) e de uma variedade de sais e compostos de baixo peso molecular (1%). A maioria das proteínas do sangue são encontradas no plasma, à exceção da hemoglobina, proteína principal da fração celular (GRAS, 1983). As proteínas do plasma podem ser adicionadas como suplemento de lisina, estabilizadoras de vitaminas, substitutas do leite ou de viteé t2 0ONINNIq5_2 0O/IKXH52a0LI5XNHo2p0O.IN/N52o0O.INN5Lh2 0O_L_I.hgo uç O.IN/N52

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS:

4.1 Artigo 1

ISOLAMENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS DE LEITES FERMENTADOS COMERCIAIS[1]

Diala URNAU[2], Leadir L. M. FRIES[3*], Nelcindo N. TERRA[3], Andréia CIROLINI[2], Liana I. G. MILANI[3], Bibiana A. dos SANTOS[4]

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

---

[1] Manuscrito recebido em

[2] Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCR, UFSM.
[3] Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. *Email: lucymicro@yahoo.com.br
[4] Graduação em Farmácia e Bioquímica CCS, UFSM.
* A quem a correspondência deve ser enviada.

RESUMO

O objetivo do trabalho visa isolar cepas de *Lactobacillus* e Bifidobactérias a partir de leites fermentados para serem adicionadas em salames tipo Italiano, bem como sua caracterização probiótica. A contagem das colônias foi realizada em meio MRS ágar pela técnica de semeadura em profundidade, com contagens superiores a 10^7 UFC.mL^{-1}. As cepas de Bifidobactérias foram isoladas de leites fermentados através da técnica 'spread-plate' em meio seletivo, MRS (De Man Rogosa Sharpe Agar, Oxoid) suplementado com neomicina, paromomicina, ácido nalidíxico e cloreto de lítio. Cepas individuais foram confirmadas por coloração de Gram e prova da catalase, e identificadas pelo *kit* Api 20 A (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France). Os *Lactobacillus* foram confirmados pela coloração de Gram e prova da catalase, e identificados pelo *kit* Api 50 CHL Medium (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France). As cepas de encontradas no *kit* Api 20 A foram: *Actinomyces israelii*, *Actinomyces haeslundii*, *Lactobacillus acidophilus/jensenii* e *Bifidobacterium spp 2*. No *kit* Api 50CHL Médium foram encontrados: *Lactococcus lactis ssp lactis 2* e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1*. Para as cepas de *Bifidobacterium spp 2* e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1*, foram realizados testes de resistência ao cloreto de sódio adicionado ao ágar MRS, nas concentrações de 1%, 1,5%, 2 %, 2,5% e 3% e resistência ao nitrito e nitrato, que foram realizados pelo mesmo procedimento, utilizando concentrações de 80, 100, 120, 150 e 200 ppm. Os testes de resistência a bile 0,3% e a acidez, em pH: 3,0; 2,5 e 2,0 de HCl 3M durante 3 e 6 horas também foram realizados. Ambas as cepas foram resistentes a todas as concentrações de cloreto de sódio, nitrito e nitrato, a bile e ao pH de 3,0 durante 3 horas e 6 horas. Portanto, as cepas em questão podem ser usadas como probióticos em salame tipo Italiano, uma vez que passaram pelos testes de resistência.

Palavras-chaves: Bifidobactérias, *Lactobacillus*, probiótico, resistência, salame.

SUMMARY: ISOLATION OF PROBIOTIC STRAINS FROM COMMERCIAL FERMENTED MILKS

This work aim the isolation of *Lactobacillus* and Bifidobactérias strains from fermented milk to be add in Italian salamis, and their probiotic characterization. The colony count was done in MRS agar medium, with counting exceeding 10^7 UFC.mL^{-1}. The Bifidobacterias strains were isolated from fermented milks through the 'spread-plate' technical in the selection media, MRS (De Man Rogosa Sharpe Agar, Oxoid) supplemented with neomycin, paromomicin, nalidixic acid and lithium chloride. Individual strains were confirmed by Gram stain, and catalase test,

and identified by kit Api 20 A (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France). The *Lactobacillus* were confirmed by Gram stain, catalase test and identified by kit Api 50 CHL Medium (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France). The strains found Api 20 A were: *Actinomyces israelii*, *Actinomyces haeslundii*, *Lactobacillus acidophilus/jensenii* and *Bifidobacterium spp* 2. In the Api 50CHL Médium were found: *Lactococcus lactis ssp lactis 2* and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1. For the *Bifidobacterium spp* 2 and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 strains, the following resistance tests were done: 1%, 1.5%, 2%, 2.5% and 3% sodium chloride concentrations added to MRS agar, and resistance to nitrate and nitrite, which were made by the same procedure, using 80, 100, 120, 150 and 200 ppm. Also, the 0,3% of bile and acidity at pH 3.0, 2.5 and 2.0 HCl 3M for 3 and 6 hours resistance tests were done. Both strains were resistant to all the concentrations of sodium chloride, nitrite and nitrate, the bile and pH of 3.0 for 3 hours and 6 hours. Therefore, the isolated strains tested can be used as probiotics in Italian salamis.
Keywords: Bifidobacterias, *Lactobacillus*, probiotic, resistence, salamis.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, vários produtos lácteos suplementados com bifidobactérias estão disponíveis no mercado alimentício. A definição legal destes produtos probióticos é ainda rudimentar. A legislação suíça de alimentos estipula que os microrganismos probióticos têm que estar presentes em um nível mínimo de 10^6 UFC de bifidobacteria$\cdot g^{-1}$ no final do prazo de validade dos produtos que os contêm (ANON, 2002). Não está estabelecida a quantidade ótima de consumo de produtos contendo bactérias probióticas necessárias para promover benefícios nutricionais aos consumidores (GILLILAND et al., 2002). VINDEROLA & REINHEIMER (2000) sugerem níveis acima de 10^7 UFC por grama ou mililitros do produto para serem garantidos efeitos funcionais fisiológicos. Outros autores preconizam número mínimo de células viáveis de 10^5 UFC.g^{-1} (SAMONA & ROBINSON, 1994; SHAH et al., 1995). Possivelmente essas contagens sejam ainda efetivas no caso de produtos lácteos consumidos com freqüência regular (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000).

Os produtos fermentados que contêm microrganismos vivos foram usados tradicionalmente para restaurar a saúde do intestino. Tal utilização dos microrganismos vivos para melhorar a saúde do anfitrião forma a base do conceito sobre probiótico.

Probióticos foram definidos como os microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do anfitrião (FAO/WHO, 2002). Esta definição sugere que a segurança e a eficácia dos probióticos têm que ser demonstrados para cada cepa e cada produto. As cepas selecionadas, principalmente pertencendo aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, estão sendo usadas cada vez mais como probióticos. Depois de ingeridos, devem superar barreiras biológicas, incluindo o ácido no estômago e bile no intestino, para alcançar seu local de ação a fim exercer seus efeitos de promover saúde. Para produzir benefícios terapêuticos, um número suficiente de microrganismos viáveis deve estar presente durante toda a vida útil do produto. Entretanto, estes organismos mostram freqüentemente pobre viabilidade nas preparações comerciais (RAVULA & SHAH, 1998).

Portanto, este trabalho visa o isolamento de cepas probióticas de leites fermentados, bem como testar sua capacidade quanto à viabilidade probiótica e resistência a sais de cura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Método de Isolamento

2.1.1 Bifidobactérias

Foram coletadas amostras de 5 (cinco) diferentes leites fermentados comerciais (leite fermentado, iogurte e leite acidófilo). Para bifidobactérias, 1mL da amostra foi dissolvida em 9 mL de água peptonada tamponada (Oxoid, Madrid, Spain) e a partir desta, foram obtidas 10 diluições em série. As amostras foram semeadas em meio seletivo, MRS suplementado com neomicina, paromomicina, ácido nalidíxico e cloreto de lítio, conforme ROY (2001), através da técnica ‘spread-plate’. Todas as placas foram incubadas anaerobicamente a 37°C, por 72 horas. Subseqüentemente, 14 colônias isoladas foram repicadas e purificadas em caldo MRS contendo HCl-cisteína. Cepas individuais foram confirmadas através da coloração de Gram, prova da catalase e identificadas pelo *kit* Api 20 A (Bio Merieux SA, Marcy L’Etoile, France).

2.1.2 *Lactobacillus*

Foram isoladas cepas de *Lactobacillus* a partir de 5 (cinco) amostras de leites fermentados comerciais (leite fermentado, iogurte e leite acidófilo) em meio MRS ágar

2.4 Teste da sensibilidade das culturas probióticas frente diferentes concentrações de sais de cura

As cepas probióticas isoladas foram testadas quanto à resistência ao cloreto de sódio, que foi adicionado ao ágar MRS (ANON, 2002) nas concentrações de 1%, 1,5%, 2 %, 2,5% e 3% através da semeadura em superfície. Os testes de resistência ao nitrito e nitrato de sódio foram realizados pelo mesmo procedimento utilizando concentrações de 80, 100, 120, 150 e 200 ppm adicionadas ao ágar MRS (ARIHARA & ITOH, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cepas isoladas

Todas as amostras de leites fermentados apresentaram contagens superiores a 10^7 UFC.mL^{-1}, ou seja, todos os produtos analisados possuíam microrganismos vivos. GRAND, KÜFFER & BAUMGARTNER (2003) também realizaram contagens em leites fermentados e todos continham mais de 10^6 UFC bifidobactérias.g^{-1}. As tabelas abaixo apresentam o resultado da coloração de Gram, da prova da catalase e dos kits utilizados para identificação.

Tabela 1: Identificação e número das bifidobactérias encontradas nos leites fermentados, bem como suas características quanto à coloração de Gram e a catalase.

Cepas identificadas*	Nº cepas	Gram	Catalase
Actinomyces israelii	02	+	-
Actinomyces naeslundii	01	+	-
Lactobacillus acidophilus/jensenii	01	+	-
Bifidobacterium spp 2	10	+	-

* Api 20 A (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France).

Tabela 2: Identificação e número dos lactobacilos encontrados nos leites fermentados, bem como suas características quanto à coloração de Gram e a catalase.

Cepas identificadas*	Nº cepas	Gram	Catalase
Lactococcus lactis ssp lactis 2	02	+	-
Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1	08	+	-

* Api 50 CHL Medium (Bio Merieux SA, Marcy L'Etoile, France).

As cepas *Bifidobacterium spp* 2 e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 foram selecionadas para serem testadas, através dos testes de resistência aos sais de cura, ao ácido e a sais biliares para futura utilização como probióticos em salames tipo Italiano.

3.2 Resistência ao pH e aos sais biliares

A viabilidade de cepas probióticas é considerada importante a fim assegurar sua ótima funcionalidade. Após a ingestão, estas bactérias devem superar duas barreiras biológicas principais, o ambiente ácido do estômago e a secreção de bile no duodeno (LANKAPUTHRA & SHAH, 1995).

Para agir como um probiótico, uma cepa deve sobreviver às condições do estômago. A sobrevivência das bactérias no suco gástrico depende de sua habilidade de tolerar o pH baixo. O pH do suco secretado no estômago é 0,9. Entretanto, a presença do alimento eleva o valor do pH local para o nível de pH 3. Após a ingestão do alimento, o tempo para que o estômago esvazie é de 2 a 4 horas (GOLDIN & GORBACH, 1992).

Com a contagem inicial de 9,07 Log UFC·mL^{-1}, o *L. paracasei ssp paracasei 1* apresentou contagens inferiores a 10^6 UFC.mL^{-1} em pH 2,0 (Tabela 3). Nas primeiras 3 horas de exposição, a contagem decresceu 37,93% e após 6 horas diminui 58,21%, passando a contagem final para 3,79 Log UFC·mL^{-1}. Segundo LIN et al. (2006), bactérias ácido lácticas são significativamente afetadas pela acidez. Células viáveis decresceram de 14,33 a 33,30% após 3 e 6 horas de incubação, respectivamente, em pH 2,5. Em pH 3,0, apresentou decréscimos menores que 11,35%.

Tabela 3: Contagem do *L. paracasei ssp paracasei 1* (Log UFC·mL^{-1}) após exposição ao pH 2,0; 2,5 e 3,0 em meio MRS acidificado com HCl 3M, durante 3 e 6 horas
.

Contagem Log UFC.mL^{-1} do *L. paracasei ssp paracasei 1*			
Horas	**pH 2,00**	**pH 2,50**	**pH 3,0**
3	5,63	7,77	8,59
6	3,79	6,05	8,04

Na Tabela 4, observa-se que a cepa de *Bifidobacterium spp 2*, que apresentou contagem inicial de 9,40 Log UFC·mL^{-1}, perdeu sua viabilidade probiótica após exposição de 6 horas para as medidas de pH de 2,0 e 2,5, apresentando redução da população inicial de 60,96% e 55,53%, respectivamente. No entanto, quando submetida ao pH 3,0 manteve contagens superiores a 10^6 UFC·mL^{-1}, concordando com os resultados encontrados por ERKKILÃ & PETÃJÃ (2000) para cepas de *Pediococcus acidilactici* (P2), *Lactobacillus curvatus* (RM10) e *P. pentosaceus* (FF).

Tabela 4: Contagem de *Bifidobacterium spp 2* após exposição ao pH 2,0; 2,5 e 3,0 em caldo MRS acidificado com HCl 3M, durante 3 e 6 horas.

Contagem Log UFC.mL^{-1} de *Bifidobacterium spp 2*			
Horas	**pH 2,00**	**pH 2,50**	**pH 3,0**
3	6,64	7,68	8,04
6	3,67	4,18	7,88

A Tabela 5 mostra que as cepas analisadas apresentaram resistência aos sais biliares, onde cada uma diminuiu apenas um ciclo logaritmo após a exposição de 4 horas aos sais biliares 0,3%, permanecendo com viabilidade probiótica. Segundo KLINGBERG et al. (2005), a cepa de *Lactobacillus paracasei* não sobreviveu ao pH 2,5, porém sobreviveu a 0,3% de sais biliares por 4 horas. No estudo feito por PENNACCHIA et al. (2004), 89,3% das cepas de *Lactobacillus* tiveram a capacidade de crescimento em ágar MRS contendo 4,0% de sais biliares.

Tabela 5: Capacidade de crescimento das cepas probióticas isoladas de produtos lácteos fermentados frente à ausência e presença de 0,3% de sais biliares, no período de 4 horas.

	Contagem Log UFC.mL^{-1}	
Cepas	Sem bile	0,3% Bile
L. paracasei	7,96	6,91
Bifidobacterium spp 2	8,72	7,30

3.3 Resistência aos sais de cura

As cepas de *Bifidobacterium spp 2* e *L. paracasei ssp paracasei 1* apresentaram crescimento em meio MRS adicionado de 1%, 1,5%, 2 %, 2,5% e 3% de cloreto de sódio (NaCl), e em 80, 100, 120, 150 e 200 ppm de nitrato e nitrito de sódio, concordando com os resultados encontrados por MACEDO et al. (2005). Segundo ARIHARA e ITOH (2000), os produtos cárneos no Japão devem receber a adição de 3% de cloreto de sódio e 200 ppm de nitrito de sódio para a manutenção da segurança microbiológica. Portanto, as cepas analisadas podem ser usadas em produtos cárneos contendo estas concentrações de sais de cura.

4. CONCLUSÃO

As cepas encontradas foram *Actinomyces israelli*, *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophylus/jensenii*, *Bifidobacterium spp 2*, *Lactococcus lactis ssp lactis 2* e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* apresentaram contagens superiores a 10^7 UFC.mL^{-1}.

As cepas *Bifidobacterium spp 2* e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1* apresentaram viabilidade probiótica após aprovação nos testes de resistência ao ácido, sais biliares e sais de cura. Portanto, estas cepas são promissoras candidatas a culturas probióticas em produtos cárneos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION**. Compendium of methods for the microbiological examination of food**. 3. ed. Washington: APHA, 1992.

ANON. **Lebensmittelverordnung** vom 26. Juni 1995, Stand am 7. Mai 2002 (LMV, SR 817.02). Eidgenössische Druck- und Materialzentrale, Ch-3003 Bern

ARIHARA, K.; ITOH, M. UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 227-230, 2000.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 281-370, 2002.

ERKKILÃ, S.; PETÃJÃ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 297-300, 2000.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization.** Working Group Report, 2002.

GILLILAND, S. E., STALEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance of bile tolerance of *Lact. acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 3045-3051, 1984.

GILLILAND, S. E.; REILLY, S. S.; KIM, G. B.; KIM, H. S. Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacterias in a yogurt-like product. **Food Microbiology and Safety**, v. 67, n. 8, p. 3091-3095, 2002.

GOLDIN, B.; GORBACH, S. **Probiotics for humans**. In R. Fuller: Probiotics - the scientific basis. London: Chapman and Hall, 1992. p. 355-376.

GRAND, M.; KÜFEER, M.; BAUMGARTNER, A. Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products. **Eur Food Res Technol**, v. 217, p. 90-92, 2003.

HYRONIMUS, B.; LE MARREC, C.; HADJ SASSI, A.; DESCHAMPS, A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology** , v. 61, n. 2-3 , 1 , p.193-197, 2000.

KLINGBERG,T. D.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K.; ELSSER, D.; BUDDE, B. B. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 419- 431, 2005.

LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp*. in the presence of acid and bile salts. **Cult Dairy Prod J,** v. 30, p. 2-7, 1995.

LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology,** v. 23, p. 74-81, 2006.

MACEDO, R. E. F.; PLANZER JR; S. B.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Características de culturas lácticas probióticas para uso em produtos cárneos fermentados: sensibilidade aos sais de cura e uso de antibióticos para contagem seletiva. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 23, n. 1, jan./jun, 2005

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v.67, p.309-317, 2004.

RAVULA, R. R.; SHAH, N. P. Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. **Aus J Dairy Technol,** v. 53, p.175-179, 1998.

ROY, D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p. 167-182, 2001.

SAMONA, A.; ROBINSON, R. K. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. **Journal of Society of Dairy Technology**, v. 47, n.2, p. 58-60, 1994.

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V.; BRITZ, M. L.; KYLE, W. S. A. Survival of Lactobacillus acidophilus and *Bifibobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 5, p. 515-521, 1995.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

ZAYED G.; WINTER J. Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli. **Applied Microbrobiology Biotechnology**, v. 44, p. 362-366, 1995.

4. 2 Artigo 2

SALAMIS MADE WITH ISOLATED PROBIOTIC AND STARTER STRAINS MULTIPLIED IN A CULTURE MEDIUM USING SWINE PLASMA[1]

Diala URNAU, Leadir L. M. FRIES[*], Nelcindo N. TERRA, Andréia CIROLINI, Liana I. G. MILANI, Bibiana A. DOS SANTOS

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

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

---

[1] This study was for Mater's degree of the first author.

[2] * Corresponding author: Fax: +5532208254
Email address: lucymicro@yahoo.com.br (L. Fries)

ABSTRACT

In this study the *Lactococcus lactis spp lactis 2* strain was inoculated in the swine plasma medium in a fermentator. *Bifidobacterium spp 2* (Bs2) and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1*(Lpp1) *c*ultures were sowed with a mixture of swine plasma and agar through a streak plate method. The control salami treatment was with commercial strains of *Staphylococcus xylosus* and *Lactococcus lactis*. All other treatments were inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* and *L. lactis ssp lactis*. T1: with the isolated *starters;* T2: with the probiotic strain Lpp1 and T3: probiotic strain Bs2. All batches passed through microbiological, physical-chemical and sensorial analyses. The fermentation in a swine culture medium achieved levels of 5.52 Log CFU.mL^{-1} to 8.58 Log CFU.mL^{-1} and OD of 0.14 to 0.882, respectively, in 27 hours. The results of all the physical and chemical parameters were up to standards and showed a good sensory characteristics. The probiotics salamis had cells in a viable state for 30 days of storage.

Keywords: probiotic, starter, isolate, salamis, swine plasma.

1. INTRODUCTION

Animal blood produced in slaughterhouses represents the most problematic by-product of the meat industry (Cherya, 1986; Dorfner, 1991) due to the high volumes generated and its very high pollutant load.

Blood has two fractions: the liquid one, called plasma, and the cellular fraction, the red cells. Plasma is basically composed of proteins (7%), water (91%) and a variety of salts and other low molecular weight compounds (1%). Practically all the blood proteins are found in the plasma, except for hemoglobin, the major protein, which is localized in the cellular fraction (Mourea, Rendueles & Díaz, 2003). Proteins constitute one of the main components of blood (Ockerman & Hansen, 1998) and these molecules have economic value, it would seem logical to consider the possibility of recovering these proteins (Wan, Ghost & Cui, 2002). An alternative solution to this problem is to process blood from slaughterhouses to produce marketable products (Harris, 1989; Walstra, 2003). The food industry could use proteins from blood as additives in dietetic or other products. The functional properties of these proteins are comparable to egg albumin and whey proteins (Crenwelge, Dill, Tybor & Landmann, 1974). Thus, the use of these proteins in the composition of a culture medium for the development of acid lactic bacteria serves not only to reduce environmental pollution, but also to develop a profitable product with similar properties to the original one.

Dairy products such as fermented milk and yoghurt are often used as carriers for probiotic cultures. Recently, attention has been directed to the use of fermented sausages as food carrier (Andersen, 1998; Arihara & Itoh, 2000; Erkkilä et al., 2000, 2001a,b; Sameshima, Busta, Peterson & Johson, 1998; Papamanoli, Tzanetakis, Lipoulou-Tzanetaki & Kotzekidou, 2003; Petäjä, Manninen, Smidtslund & Sipila, 2003; Pennacchia et al., 2004) since these products are not heated and harbour high numbers of lactic acid bacteria. However, the probiotic culture should be well adapted to the conditions of fermented sausage to become dominant in the final product since fermented meat products contain a natural high background microbiota. This is in contrast to most dairy products which are heated before addition of the probiotic cultures (Heller, 2001).

The worldwide trend of probiotics functional food consumption and the positive effect of its daily ingestion encourage the study of other types of foods, which the beneficial bacteria can be added to. In this sense, the meat field reveals as an important area of application and a great challenge to the incorporation of probiotics lactic bacteria due to its known sensitivity to salt (Andersen, 1998; Sameshima, Busta, Peterson & Johson, 1998).

The aims of this study were to multiply the isolated strains *Lactococcus, Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in a culture medium made with swine plasma and to investigate the effect of this starter and probiotic cultures on the evolution of the physic-chemical, microbiological and sensorial properties of salamis.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Elaboration of the cultures

2.1.1- Blood and plasma

Whole swine blood was collected at the time of slaughter from a federal inspection slaughterhouse, and treated by adding sodium citrate to a final concentration of 1% as an anti-coagulant.

After the blood was granted by the federal inspection for use, the blood was immediately taken to the Laboratory of Food Microbiology of the Department of Food Technology and Science – UFSM. The plasma fraction was separated by centrifugation at 3000 rpm for 30 min and stored at -18°C until use.

2.1.2- Preparation of the swine plasma medium

The elaboration of the culture medium for the propagation of *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* was based on Barboza, Márquez, Gómez and Rangel (1997) recommendations with some modifications. The medium was prepared by mixing 300 mL of swine plasma with 300 mL of distilled water and pH was adjusted to 11 with sodium hydroxide 1N. This solution, after being sterilized (121ºC/15'), was mixed with 400 mL of sterilized solution containing glucose (10g), potassium diphosphate (3g) and yeast extract (5g).

2.1.3- Microorganisms

The strains used were: *Bifidobacterium spp 2*, *Lactococcus lactis ssp lactis 2* and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1*, all isolated from fermented milk (Cirolini et al., 2007a, Cervo et al., 2007). Then, they were stored at 4°C in tubes with MRS agar.

2.1.4- Preparation of the cultures for fermentation and suspension

The cultures preparation began with the reactivation of strains kept in MRS agar, under refrigeration. *Lactococcus lactis ssp lactis 2* and Lactoba*cillus paracasei ssp paracasei 1* strains were transferred to MRS broth and incubated for 48 hours at 37°C. *Bifidobacterium spp 2* strain was transferred to MRS broth with 0,05% cysteine-HCl and incubated under anaerobic conditions for 72 hours at 37ºC.

2.1.4.1- Lactococcus lactis spp lactis 2 culture

1% (v/v) of the culture was inoculated in the swine plasma medium, in relation to the total volume. The fermentation was carried through in a fermentator with 3 liters capacity. The pH was kept in 7,0 with addition of NaOH 8% and the conditions for the culture were 100 rpm at 37ºC (± 0,1ºC) by 36 hours (Barboza, Márquez, Gómez & Rangel, 1997).

2.1.4.2- Evaluation of the fermentation

The fermentative process was monitored during the first 18 hours, where samples were collected, in duplicate, in barren bottles, with a six hours period. After this period, the samples were collected at three hours intervals until reach the stationary phase.

The counting of viable cells was carried out through pour plate method, using MRS agar, and were incubated for 48 hours at 37°C. The result was expressed in Colony Forming Units per mL ($CFU.mL^{-1}$) of sample (Siqueira, 1995). The optic density was measured in absorbance at 610 nm, using spectrophotometer (Lambda 2S Model Perkin Elmer).

2.1.4.3- Maintenance of the starter culture

After *Lactococcus lactis ssp lactis 2* strain reached the stationary phase, which was verified after suspending the addition of sodium hydroxide in the swine plasma medium, an aliquot of the fermented batter was centrifuged for 30 minutes at 3000 rpm. The pellet was rejected and the biomass was washed, resuspended in 10% (w/v) in sterilized skim milk and then frozen (-18ºC).

2.1.4.4- Bifidobacterium spp 2 and Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1 suspensions

The swine plasma medium was prepared as described previously and added 1.5% of agar for solidification. After the sterilization and the medium solidification, cultures were sowed through a streak plate method. The suspensions of *Bifidobacterium* were

incubated under anaerobic conditions for 72 hours at 37°C, while the *Lactobacillus* were incubates under aerobic conditions for 48 hours at 37°C.

2.2 - Salami processing

Salami batter consisted of lean pork (60%), frozen backfat (20%), beef (20%) and the following ingredients: NaCl (3%), $NaNO_3$ and $NaNO_2$ (0.3%), commercial antioxidant (0.25%), glucose (0.5%), sucrose (0.5%), ground white pepper (0.2%) and garlic powder (0.5%). Lean pork and backfat were ground through a 12 mm disc, and the beef in a 5 mm disc. The ground meat was kept in a refrigerator at 0°C until use. The ingredients used in this work were weighed into individual bags prior making the sausage. All meat and the sodium chloride (NaCl) were blended in a mixer during 3 minutes for myofibrillar proteins extraction. Afterwards, the other ingredients were added and the commercial antioxidant was the last one. The salami batter was divided into 4 batches: Control, Treatment 1, Treatment 2 and Treatment 3.

All cells suspension as starter cultures were added after all the other ingredients had been added, to achieve the proper inoculum level in the salami batters. The Control batch of salami batter was inoculated with commercial strains of *Staphylococcus xylosus* (Floracarn SX, Chr. Hansen) and *Lactococcus lactis* (André Tosello) at approximately 10^6 CFU·g^{-1}. The *starter* cultures were added to achieve approximately 10^7 CFU.g^{-1} in the salami batter. All other treatments were inoculated with strains of isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a) at approximately 10^6 CFU.g^{-1}. Treatment 1 was inoculated without probiotic strains, only with the *starters* strains. The Treatment 2 was inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 (Cirolini et al., 2007a) at approximately 10^8 CFU.g^{-1} in the salami batter. In the Treatment 3 the probiotic strain *Bifidobacterium spp* 2 (Cervo et al., 2007) was added at approximately 10^8 CFU.g^{-1}.

The sausage batters were stuffed into 60-mm diameter fibrous casings to make individual pieces of salami weighing approximately 150 g. The salami pieces were hung in a controlled-temperature, controlled-humidity chamber. The fermentation and ripening program applied is shown in Table 1.

Table1. Fermentation and ripening conditions applied in the maturation chamber.

Days	Temperature (ºC)	Relative humidity (%)
01	25	95
02	24	93
03	23	90
04	22	85
05	21	80
06	20	75
07 - 21	18	75

2.3 - Sampling procedures

Samples for analysis were taken at time 0 (meat mixture immediately after stuffing), day 3 (mid-fermentation), day 7 (end-fermentation), day 14 (mid-ripening) and day 21 (end-ripening process). Also, the probiotic

Twenty-five-gram portions of salami were homogenized with 225 mL of 0.1% peptone water, and serial 10-fold dilutions were used for microbiological analysis (Siqueira, 1995).

Mesophilic lactic acid bacteria (LAB) were enumerated on MRS Agar (Oxoid) in aerobic conditions after 48 h at 37°C; catalase-positive cocci in Baird - Parker after biochemical tests with rabbit plasma; total coliforms on Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Oxoid) after 24 h at 37°C and fecal coliforms at 45ºC. The probiotic strain *Bifidobacterium spp* 2 was enumerated using MRS Agar with neomycin, paromomycin, nalidixic acid and lithium chloride added to it (Roy, 2001) in anaerobic conditions after 72 h at 37°C.

2.4 - Sensory analysis

The sensory analysis was determined with 21 days of salami maturation. The sensory characteristics of color, aroma, flavor and texture were evaluated through multiple comparison test as described by Dutcosky (1996). For the assessment of the samples were used 20 not trained tasters, but consumers of salamis.

2.5 - Statistical analysis

The results of the physical-chemical and microbiological analysis were evaluated using (ANOVA) and Tukey's test for pair wise comparison of means, and the sensorial with Dunnet test, using SAS 6.12 (1996). Differences were considered to be significant when $p<0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1- *Lactococcus lactis spp lactis 2* ***culture***

The growth curve and optic density (610 nm) from *Lactococcus lactis ssp lactis 2* are shown in Figure 1. The initial count of viable cells was 5.52 Log CFU.mL^{-1} and optic density was 0.14. The growth maximum peak was at 27 hours with 8.58 Log CFU.mL^{-1} viable cells, and optic density of 0.882. After that, the curve shows a decrease in these values in both measurements. Hyun and Shin (1998) used an enzymatic hydrolysate of blood plasma for the growth of a probiotic-strain of *Lactobacillus sp.*, and their higher count was 9.71 Log CFU.mL^{-1} in 24 hours. On the other hand, Campagnol (2007) reached the maximum growth of *Lactobacillus plantarum* in 30 hours with counting of 9.82 Log CFU.mL^{-1}.

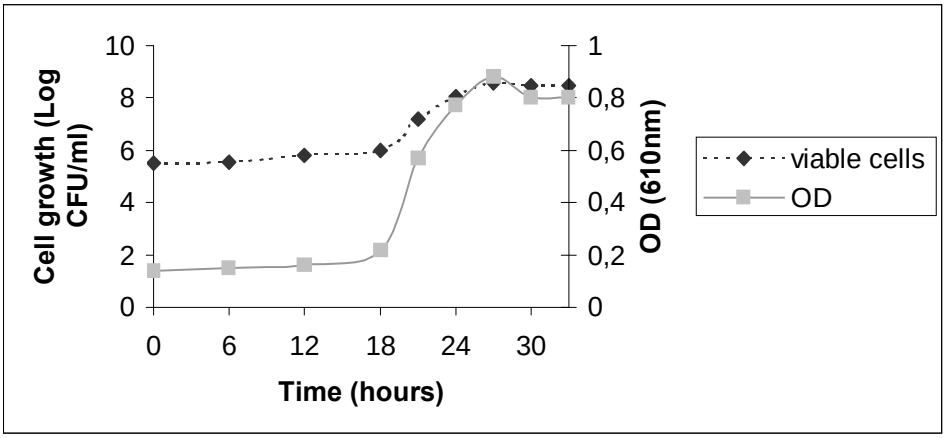


Figure 1. *Lactococcus lactis ssp lactis 2* growth curve and optic density (OD) at 610 nm.

3.2- Physical and chemical analysis

The pH on day zero was approximately 6.0 for all salamis (Figure 2). After three days, the pH of T1 decreased to 5.3, while the others reached 5.0. At mid- ripening (day-14) all pH values were statistically different, the lowest value was from Control (4.9) and the highest from Treatment 1 (5.2)

On the last day of ripening (day - 21), a slight increase in pH (5.4), due to proteolysis, was observed in T1. Coffey et al. (1998) also observed this comportment in salamis made with dairy lactococcal strains. Cenci-Goga et. al (2007) found pH values range at the ripening (day-21) of 4.90 to 5.42 when made with the addition of selected dairy-origin cultures.

Therefore, the dairy *Lactococcus lactis ssp lactis* strain was not so efficient to produce acid when used without addition of other lactic acid bacteria (LAB). Nevertheless, these pH values are within the limit for the so-called medium-acid salami. According to Terra (1998) this type of salamis made in Brazil have the pH around 5.4.

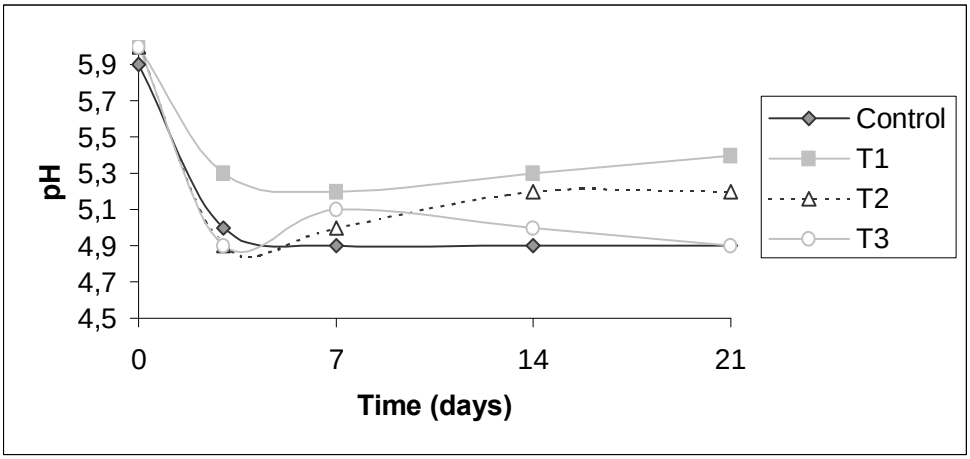


Figure 2. pH development on salamis treated with commercial and isolated cultures. Control: inoculated with commercial strains of *Saphylococcus xylosus* (Floracarn SX, Chr. Hansen) and *Lactococcus lactis* (André Tosello), Treatment 1: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a);Treatment 2: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a), and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 (Cirolini et al., 2007a); Treatment 3: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a), and *Bifidobacterium spp* 2 (Cervo et al., 2007).

The water activity (aw) curve is shown in Figure 3, where the aw mean values on day zero were 0.98 for the control and 0.99 for other batters.

During the ripening process all batters decreased the aw values. By the end of the ripening (day - 21), all salamis reached aw values around 0.80. Thus, the low pH values decreased the water holding capacity of meat, increasing the rate of the drying process. Therefore, the water activity from all salamis was <0.90, which is an important hurdle for the growth of other bacteria than LAB and Staphylococci (Kröckel, 1995).

Cenci-Goga et. al (2007) found similar values in their work with selected dairy-origin cultures (SDS cultures). On the day of stuffing, the mean aw values were above 0.95, and at the end of ripening they were between 0.75 – 0.86.

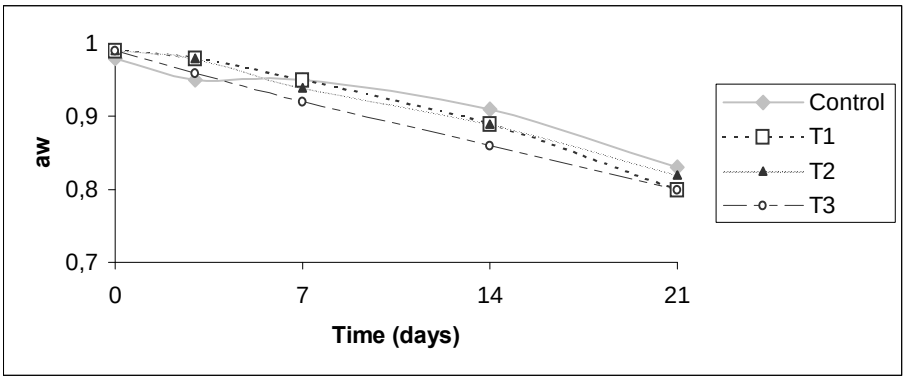
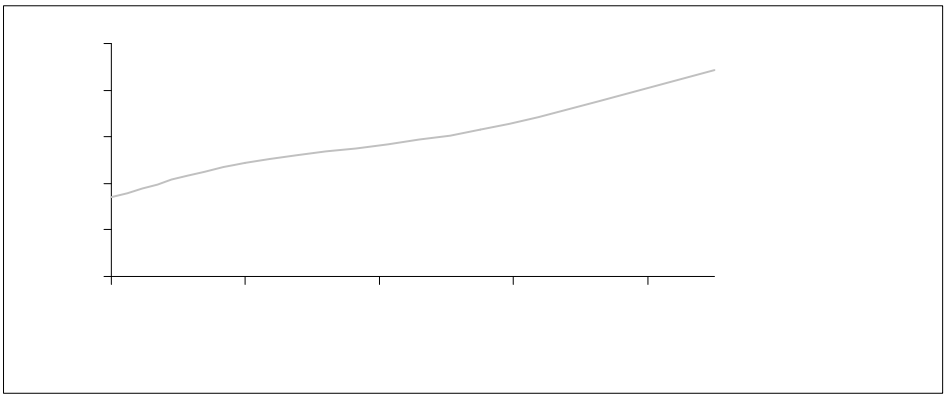


Figure 3. Water activity development on salamis treated with commercial and isolated cultures. Control: inoculated with commercial strains of *Saphylococcus xylosus* (Floracarn SX, Chr. Hansen) and *Lactococcus lactis* (André Tosello), Treatment 1: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a);Treatment 2: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a), and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 (Cirolini et al., 2007a); Treatment 3: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a), and *Bifidobacterium spp* 2 (Cervo et al., 2007).

The weight loss mean value was around 44% (Figure 4) for all treatments at the end of maturation period. This value was a little high according Rust (1994), that is between 30 - 40% for dry fermented products. Garcia-Varona, Santos, Jaime and Rovira (2000) found similar values in their work with Italian salamis, that presented a weight loss about 44%.



The results of the colour determinations are reported in Table 2. A full color development was achieved in these salamis on the day of the stuffing.

Table 2. Averages values from salamis with different treatments.

Days	Treatments	*L*	*a*	*b*
	Control	59,02a	12,40b	10,29a
	T1	52,25b	13,82a,b	9,73b
0	T2	56,93a	12,67b	10,09a,b
	T3	51,90b	15,67a	10,19a,b
	Control	56,17a	18,79a	9,52a
	T1	50,23b	17,07a	9,19a,b
03	T2	49,93b	18,46a	9,25a,b
	T3	49,42b	16,91a	8,21b
	Control	51,04a	19,75a	9,13a
	T1	47,11b	17,40a	7,88b
07	T2	45,91b	19,35a	9,10a
	T3	48,85a,b	16,95a	7,79b
	Control	49,90a	21,85a	9,06a
	T1	46,81a	17,83c	7,63a,b
14	T2	42,89a	19,60b	8,17a,b
	T3	44,90a	17,75c	6,93b
	Control	44,02a	22,30a	7,89a
	T1	42,86a	18,48b	7,56b
21	T2	41,33a	20,25a,b	6,38b
	T3	43,19a	18,03b	6,32b

Averages accompanied by the same letter, on the same column, are not significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey test. Control: inoculated with commercial strains of *Saphylococcus xylosus* (Floracarn SX, Chr. Hansen) and *Lactococcus lactis* (André Tosello), Treatment 1: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a);Treatment 2: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a), and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 (Cirolini et al., 2007a); Treatment 3: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a), and *Bifidobacterium spp* 2 (Cervo et al., 2007).

The *L** values decreased in all salamis during the fermentation and ripening process, similarly to Coffey et. al (1998) , but with significant differences. All *a** values increased during the process, because of the nitrite-cured sausage, which could be due to the reaction between NO and $MbFe^{III}$ resulting in the formation of $MbFe^{II}NO$. According to Gotterup et. al (2007) the red colour was not affected significantly by the type of strain. The pigment formation in sausages with added nitrite occurred within the first 16 h independent of the added strain and most likely as a consequence of non-

enzymatic reduction of NO^{-2} into NO, either via the pathway involving Mb itself or via the exogenously introduced reductant ascorbate.

For *b** values all range decreased, but with significant differences among the treatments. These results are according to Campagnol (2007). This decrease can be due to the lower consumption of oxygen by the microorganisms. Consequently, the oxymyoglobin decreases, resulting in a yellow color.

3.2- Microbiological analysis

Lactic acid bacteria (LAB) counts (Table 3) through fermented and ripening indicated that each strain survived well during the process. For *starter* strain, *Lactococcus lactis,* the inoculation was 10^6 CFU.g^{-1}, and the probiotic strains were 10^8 CFU.g^{-1}. On day zero the *starters* strain adapted well in the meat environment and increased the initial counts. However, the probiotics decreased the counting, propably because they were not adapted to the new environment and the meat was exposed to the air before stuffing, hardly mainly Bifidobacteria that are anaerobic strains (T3). Cenci-Goga et. al (2007) found a similar behavior when, the Lactococci counts ranged from 5.34 to 7.16 in sausages made with the addition of SDS cultures, on day zero.

Table 3. Microbiology analyses (Log CFU.g^{-1}) from salamis with different treatments.

Days	Treatments	LAB
	Control	6.97a
	T1	6.52a
0	T2	7.04a
	T3	5.82b
	Control	7.64a
	T1	7.69a
03	T2	7.05b
	T3	6.65c
	Control	7.71a,b
	T1	7.76a
07	T2	6.86c
	T3	7.52b
	Control	8.05a
	T1	7.59a,b
14	T2	7.25b
	T3	6.53c
	Control	7.66a
	T1	6.65c
21	T2	6.96b
	T3	6.04d

Averages accompanied by the same letter, on the same column, are not significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey test. Control: inoculated with commercial strains of *Saphylococcus xylosus* (Floracarn SX, Chr. Hansen) and *Lactococcus lactis* (André Tosello), Treatment 1: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a);Treatment 2: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a), and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 (Cirolini et al., 2007a); Treatment 3: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a), and *Bifidobacterium spp* 2 (Cervo et al., 2007).

On the subsequent day, in general, the strains increased the counts. At the end of maturation time, when the salamis are ready for consumption (day 21), the commercial *L. lactis* (Control) reached the highest count (7.66 Log CFU. g^{-1}) and the isolated strain (T1) showed a 6.65 Log CFU.g^{-1} growth. In T2 the total count of LABs was 6.96 Log CFU. g^{-1}. Bifidobacteria (T3) was added the bacterial counting was 6,04 Log CFU. g^{-1} , being the least adapted. For Cenci-Goga et. al (2007) lactobacilli count was from 5.56 to 8.69 for salamis made with the addition of SDS cultures.

The probiotic strains were counted during the storage period. After 30 days the LAB counts showed that T2 had 6.87 Log CFU. g^{-1} and Bifidobacteria (T3) counts was

6.96 Log CFU. g^{-1}, Therefore, the probiotics were in viable state for probiotic products. However, after 60 days, the count decreased and the salamis were not with probiotics in viable state. The counts were for T2: 4.90 Log CFU. g^{-1} and for T3: 5.02 Log CFU. g^{-1}. The daily consumption of 5g of probiotic sausage by healthy volunteers, containing *Lb. paracasei* LTH 2579, during several weeks, has shown to modulate various aspects of host immunity but there was no significant influence on serum concentration of different cholesterol fractions and triacylglycerides (Jahreis et al., 2002).

In general, the food industry has targeted populations over 10^6 bifidobacteria.g^{-1} at the time of consumption when the strain was added to the food (Samona & Robinson, 1991; Sanders, Walker, Walker, Aoyama & Klaenhammer, 1996). This standard appears to have been adopted to provide bacterial concentrations that were technologically attainable and cost-effective rather than to achieve a specific health effect in humans (Sanders, Walker, Walker, Aoyama & Klaenhammer, 1996).

The mean of total coliforms counts (data not shown) were lower than 10^4 CFU.g^{-1}, on day zero for control and T1 the lowest values were in treatments with probiotic strains (3.73 Log UFC.g^{-1} for the Control, 3.77 Log UFC.g^{-1} for the T1, 3.58 Log UFC. g^{-1} for T2 and 3.45 Log UFC.g^{-1} for T3). During the process, these microorganisms disappeared due to the low pH and the competition mechanism.

Fecal coliforms, *Salmonella* and catalase-positive cocci were not found during the process (data not shown). Therefore, the application in the formulation of starters and probiotic strains may provide an additional tool to prevent the growth and survival of potentially pathogenic bacteria. This improves the quality and the safety of the final product.

3.3- Sensory evaluation:

The sensory assessment (Table 4) by non-trained tasters indicated that both salamis produced with the probiotic strains (T2 and T3) were statistically identical in all analyzed parameters compared with the control. The T1 was considered to be the highly acceptable when the question is colour and aroma, because of the higher final pH of this

treatment. Brazilian consumers are adapted with sweet aroma and flavor, and pH around 5.4 in salamis (Terra, 1998).

Table 4. Averages values from sensory evaluation of different salami treatments.

	Control	T1	T2	T3
Color	3.95a	5.2b	4.2a	3.8a
Aroma	4.00a	5.25b	4.3a	4.55a
Flavour	4.10b	5.55a	4.85a,b	5.45a
Texture	4.00b	4,95a	4.95a	4.50a,b

Averages accompanied by the same letter, on the same line, are not significantly different ($p < 0.05$) according to Dunnet test. Control: inoculated with commercial strains of *Saphylococcus xylosus* (Floracarn SX, Chr. Hansen) and *Lactococcus lactis* (André Tosello), Treatment 1: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a);Treatment 2: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a), and *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* 1 (Cirolini et al., 2007a); Treatment 3: inoculated with isolated *starters*: *S. xylosus* (Cirolini et al., 2007b) and *L. lactis ssp lactis* (Cirolini et al., 2007a), and *Bifidobacterium spp* 2 (Cervo et al., 2007).

Considering the flavour and texture, the T1, T2 and T3 were statistically similar, but statiscally better than the control for flavour, and for texture, T1 and T2 had the same value and a higher value compared with the control. In general, the treatments with isolated strains were better than the Control, with commercial strains.

4. CONCLUSION

At the end of this study, it was concluded that isolated strains developed well in the culture medium using swine plasma.

The salamis produced by isolated strains were within the parameters of the physical, chemical and microbiological standards, and were sensorially more accepted than the control.

The probiotic dry fermented sausages expired date up to 30 days, so within this period the probiotics bacteria have been in a viable state of more than 10^6 probiotics bacteria g^{-1}.

More studies are needed to explore the potential use of isolated probiotic bacteria on salamis elaboration.

5. REFERENCES

Andersen, L. (1998). Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures. In: 44 ed. International Commitment of Meat Science and Technology, Anais. 1998. p. 826-827.

Arihara, K.; Itoh, M. (2000). UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation. International Journal of Food Microbiology, 56, 227-230.

Barboza, Y.; Márquez, E.; Gómez, O.; Rangel, L. (1997). Development of a bovine plasma medium for propagation of lactobacilli. Journal of Food Science Technology, 34 (2), 261-263.

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

Cenci-Goga, B. T. et al. Use of starter cultures of dairy origin in the production of Salame Nostrano, an Italian dry-cured sausage. Meat Science, doi:10.1016/j.meatsci.2007.07.001. 2007.

Cervo, G. D.; Fries, L. L. M.; Terra, N. N.; Cirolini, A; Milani, L. I. G.; Urnau, D.; Satos, B. A.; Baldissera, E. M.; Rezer, A. P. Isolamento de Bifidobactérias com propriedades probióticas. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 7, 2007, Campinas. ANAIS: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007. CD-ROM.

Cherya, M. Ultrafiltration handbook, Technomic Pub. Co. Inc., Pennsylvania (1986).

Cirolini, A.; Fries, L. L. M.; Terra, N. N.; Milani, L. I. G.; Urnau, D.; Satos, B. A; Cervo, G. D.; Baldissera, E. M.; Rezer, A. P. Isolamento de *Lactobacillus* com propriedades probióticas. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 7, 2007, Campinas. ANAIS: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007a. CD-ROM.

Cirolini, A.; Fries, L. L. M.; Terra, N. N.; Milani, L. I. G.; Urnau, D.; Satos, B.A; Cervo, G. D.; Baldissera, E. M.; Rezer, A. P., Padilha, V. S.; Trevisan, A. P. Isolamento e caracterização de *Staphylococcus xylosus* de salames coloniais. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 7, 2007a, Campinas. ANAIS: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007b. CD-ROM.

Coffey, A.; Ryan, M.; Ross, R.P.; Hill, C.; Arendt, E.; Schwarz, G. (1998). Use of a broad-host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* transconjugant as an alternative starter for salami manufacture. International Journal of Food Microbiology, 43, 231-235.

Crenwelge, D. D.; Dill, C. W.; Tybor, P. T.; Landmann, W. A. (1974). A comparison of emulsification capacities of some protein concentrates. Journal of Food Science, 39 (910), 175-177.

Dorfner, I. E.; Gruyter, W., New York (1991). In: DEL HOYO, P.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. Meat Science. doi:10.1016/j.meatsci.2007.07.024, 2007.

Dutcosky, S. D. Análise sensorial de alimentos. Paraná: Editora Universitária Champagnat, 1996.

Erkkilä, S., Venalainen, M., Hielm, S., Petajä, E., Puolanne, E., Mattila-Sandholm, T. (2000). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry sausage fermented by probiotic lactic acid bacteria. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 2101-2104.

Erkkilä, S.; Suihko, M. L.; Eerola, S.; Petãjã, E.; Mattila-Sandholm, T. (2001a). Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. International Journal of Food Microbiology, 64, 205-210.

Erkkilä, S.; Petãjã, E.; Eerola, S.; Lilleberg, L.; Mattila-Sandholm, T.; Suihko, M. L. (2001b). Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meta starter cultures. Meat Science, 58, 111-116.

Garcia-Varona, M.; Santos, E. M.; Jaime, I.; Rovira, J. (2000). Characterization of *Micrococcaceae* isolated form different varieties of Chorizo. International Journal of Food Microbiology, 54, 189-195.

Gotterup, J. et al. (2007). Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. Meat Science, doi:10.1016/j.meatsci.2007.07.023.

Hansen, E. B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. International Journal of Food Microbiology, 78, 119-131.

Harris, E. R. V. Protein purification methods: A practical approach. Oxford University, Oxford, UK, 1989.

Heller, K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. American Journal of Clinical Nutrition, 73, 374S- 379S.

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

Jahreis, G.; Vogelsang, H.; Kiessling, G.; Schubert, R.; Bunte, C.; Hammes, W. P. (2002). Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. Food Research International, 35, 133-138.

Kröckel, L., 1995. Bacterial fermentation of meats. In: Campbell-Platt, G. and Cook, P.E., Editors, 1995. Fermented Meats, Blackie Academic and Professional, England, p. 69-109.

Mourea, F.; Rendueles, B. M.; Díaz, M. (2003). Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange cromatography. Meat Science, 64, 391-398.

Ockerman, H. W.; Hansen, C. L. Animal by-product processing and utilization, CRC Press, Florida, USA, (1998).

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Science, 65, 859-867.

Pennacchia, C.; Ercolini, D.; Blaiotta, G.; Pepe, O.; Mauriello, G.; Villani, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science, 67, 309-317.

Petäjä, E.; Manninen, T.; Smidtslund, P.; Sipila, K. (2003). Probiotic lactic acid bacteria as starters - applicability in raw ham and fermented meat products made from coarsely ground pork. Fleischwirtschaft, 83, 97-102.

Rebecchi, A.; Crivori, S.; Sarra, P. G.; Cocconcelli, P. S. (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. Journal of Applied Microbiology, 84, 1043-1049.

Roy, D.; Desjardins, M. L.; Mondou, F. (1995). Selection of bifidobacteria for use under cheese making conditions. Milchwissenschaft, 50, 139-142.

Roy, D. (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 69, 167-182.

Rust, R. E. Productos Embutidos. In: Price, J.F., Schweigert, B.S. (Org) Ciencia de la carney Productos Carnicos. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 1994, p. 415-440.

Sameshima, T.; Busta, F. F.; Peterson, E. H.; Johson, M.G. Colony Count Methods. In: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. F. Compéndium of methods for the microbiological examination of foods. 3 ed. Washington: Amercian Public Health Association, p. 75-76, 1998.

Samona, A.; Robinson, R. K. (1991).Enumeration of bifidobacteria in dairy products. J. Soc. Dairy Technol., 44, 64–66.

Sanders, M. E.; Walker, D. C.; Walker, K. M.; Aoyama, K.; Klaenhammer, T. R. (1996). Performance of commercial cultures in fluid milk applications. J. Dairy Sci., 79, 943-955.

SAS. Sas Institute Inc. Cary, NC, 1996.

Siqueira, S. Manual de microbiologia de alimentos. 1ª edição. Brasília: Embrapa, 1995.

Terra, N. N. Apontamentos de Tecnologia de carnes. São Leopoldo: UNISINOS, 1998. 216 p.

Terra, N. N.; BRUM, M. A. R. Carne e seus derivados: Técnicas de Controle de Qualidade. São Paulo: Nobel,.1988. 121p.

Walstra, P. Physical chemistry of foods, Marcel Decker Inc., New York. 2003.

Wan, Y.; Ghost, R.; Cui, Z. (2002). High resolution plasma protein fractionation using ultrafiltration, Desalination, 144, 301-306.

5 DISCUSSÃO

Todas as amostras de leites fermentados comerciais analisados apresentaram contagens superiores a 10^7 UFC.mL^{-1}, ou seja, todos os produtos analisados possuíam microrganismos vivos. GRAND, KÜFFER & BAUMGARTNER (2003) realizaram contagens em leites fermentados, e todos continham mais de 10^6 UFC bifidobactérias.g^{-1}. As cepas encontradas nos leites fermentados foram: *Lacotcoccus lactis ssp lactis 2, Bifidobacterium spp 2* e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1*.

As cepas para serem adicionadas ao salame como probióticos foram testadas quanto à resistência ao pH, aos sais biliares e sais de cura.

A viabilidade de cepas probióticas é considerada importante a fim de assegurar sua ótima funcionalidade. Após a ingestão, estas bactérias devem superar duas barreiras biológicas principais, o ambiente ácido do estômago e a secreção de bile no duodeno (LANKAPUTHRA & SHAH, 1995). Para agir como um probiótico, uma cepa deve sobreviver às condições do estômago. A sobrevivência das bactérias no suco gástrico depende de sua habilidade de tolerar o pH baixo. O pH do suco secretado no estômago é 0,9. Entretanto, a presença do alimento eleva o valor do pH local para o nível de pH 3. Após a ingestão do alimento, o tempo para que o estômago esvazie é de 2 a 4 horas (GOLDIN & GORBACH, 1992).

Com a contagem inicial de 9,07 Log UFC·mL^{-1}, o *L. paracasei ssp paracasei 1* apresentou contagens inferiores a 10^6 UFC.mL^{-1} em pH 2,0. Nas primeiras 3 horas de exposição, a contagem decresceu 37,93% e após 6 horas diminui 58,21%, passando a contagem final para 3,79 Log UFC·mL^{-1}. Segundo Lin et al. (2006), bactérias ácido lácticas são significativamente afetadas pela acidez. Células viáveis decresceram de 14,33 a 33,30% após 3 e 6 horas de incubação, respectivamente, em pH 2,5. Em pH 3,0, apresentou decréscimos menores que 11,35%.

A cepa de *Bifidobacterium spp 2*, que apresentou contagem inicial de 9,40 Log UFC·mL^{-1}, perdeu sua viabilidade probiótica após exposição de 6 horas para as medidas de pH de 2,0 e 2,5, apresentando redução da população inicial de 60,96% e 55,53%, respectivamente.

As cepas analisadas apresentaram resistência aos sais biliares, sendo que cada uma diminui um ciclo logaritmo, após a exposição de 4 horas aos sais biliares 0,3% resultando em contagens de 6,91 Log UFC.mL^{-1} de *L. paracasei* e 7,30 Log UFC.mL^{-1} de *Bifidobacterium*. Segundo Klingberg et al. (2005), a cepa de *Lactobacillus paracasei* não sobreviveu ao pH 2,5, porém sobreviveu a 0,3% de sais biliares por 4 horas. No estudo feito por Pennacchia et al. (2005), 89.3% das cepas de *Lactobacillus* tiveram a capacidade de crescimento em ágar MRS contendo 4,0% de sais biliares.

No teste de resistência aos sais de cura, as cepas em questão apresentaram crescimento em meio MRS adicionado de 1%, 1,5%, 2 %, 2,5% e 3% de cloreto de sódio (NaCl), e em 80, 100, 120, 150 e 200 ppm de nitrato e nitrito de sódio, concordando com os resultados encontrados por Macedo et al. (2005). Segundo Arihara & Itoh (2000), os produtos cárneos, no Japão, devem receber a adição de 3% de cloreto de sódio e 200 ppm de nitrito de sódio para a manutenção da segurança microbiológica.

No segundo experimento deste trabalho realizou-se a multiplicação do *Lactococcus lactis ssp lactis 2* em meio de cultura com plasma suíno alcançando níveis de 5,52 Log UFC.mL^{-1} a 8,58 Log UFC.mL^{-1} e densidade óptica de 0,14 a 0,882, em 27 horas de fermentação. Hyun & Shin (1998) usaram um hidrolisado enzimático de plasma bovino como fonte de nitrogênio na elaboração de um meio de cultura para o crescimento de *Lactobacillus sp*, e conseguiram um crescimento de 9,71 Log UFC.mL^{-1} em 24 horas de fermentação. Já, CampagnoL (2007) utilizou a mesma formulação do plasma suíno e obteve crescimento do *Lactobacillus plantarum* em 30 horas com contagens de 9,82 Log UFC.mL^{-1}.

No decorrer da fermentação, onde bactérias láticas comerciais e isoladas foram testadas, observou-se que os pHs de todos os tratamentos diminuíram. No dia zero, o pH de todos os lotes foi de aproximadamente 6,0. Após três dias, o pH do T1 mostrou-se, estatisticamente, maior ($p<0,05$), pH de 5,3 enquanto que os outros tratamentos o pH diminuiu para 5,0. Na metade da maturação (14° dia), os pHs dos diferentes tratamentos foram, estatisticamente diferentes, sendo que o tratamento Controle apresentou o valor mais baixo (4,9) e o tratamento T1 o pH mais alto (5,2). No último dia da maturação (21°dia), o T1 obteve uma pequena elevação em seu pH (5,4),

provavelmente, devido a uma proteólise, enquanto, que o tratamento Controle e o T3 apresentaram pH, estatisticamente iguais (4,9) e o T2 com pH de 5,2. O baixo pH externo perturba a homeostase dos diferentes agentes patogênicos (*Salmonella spp., Clostridium sp.),* bem como bactérias deteriorantes, como *Pseudomonas* e enterococos (LEISTNER, 2000).

Portanto, notou-se uma acidificação mais fraca em tratamentos contendo a cepa de *L. lactis ssp lactis 2*. Coffey et al. (1997) também observaram este comportamento em salames elaborados com cepas de lactococcos de origem láctea. Cenci-Goga et. al (2007) encontraram valores de pHs ao final da maturação de 4,90 a 5.42 em salames fabricados com adição de culturas selecionadas de origem láctea.

A atividade de água no dia zero foi de 0,98 para o lote controle e 0,99 para os outros tratamentos. Durante a maturação, todos os lotes diminuíram seus valores. No final (21° dia), todos os valores medidos foram estatisticamente iguais, em torno de 0,80. Assim, os valores baixos de pH diminuem a capacidade da massa cárnea de reter água, incrementando o processo de secagem. Portanto, a atividade de água de todos os lotes foi abaixo de 0,90, sendo considerado um importante obstáculo para o crescimento de outras bactérias (KRÖCKEL, 1995).

A perda de peso ficou em média de 44%. Esses valores ficaram um pouco acima da faixa considerada ideal, de 30 a 40% (RUST, 1994).

Na determinação da cor dos salames os valores de L* diminuíram em todos os lotes, semelhantemente a Coffey et al. (1998), mas com diferenças significativas entre os tratamentos. Todos os valores de *a** aumentaram durante o processo, em razão da adição de nitrito, o que poderia ser devido a reação entre NO e $MbFe^{III}$ resultando na formação de $MbFe^{II}NO$. Segundo Gotterup et al. (2007), a cor vermelha não foi significativamente afetada pelo tipo de cepa. A formação do pigmento em salames com adição de nitritos ocorre dentro das primeiras 16 horas independente da cepa acrescentada e muito provavelmente em conseqüência da redução não-enzimática de NO^{-2} a NO, através da via envolvendo Mb própria ou através de via exógena com ascorbato. Todos os valores de *b** diminuíram, mas com diferença significativa entre os tratamentos, estes resultados estão de acordo CampagnoL et al. (2007). Esta

diminuição pode ser devido ao menor consumo de oxigênio pelos microrganismos, conseqüentemente diminuição da oximioglobina resultando em uma cor amarela.

Através das contagens das bactérias ácido lácticas (BAL) durante a fermentação e maturação, comprovou-se que as cepas sobreviveram bem durante todo processo. No dia zero, os *starters* isolados e comerciais adaptaram-se bem ao ambiente cárneo e aumentaram as contagens iniciais. Os probióticos isolados de produtos lácteos decresceram, devido o novo ambiente e provavelmente pelo longa período de exposição ao ar antes do embutimento, sendo que as Bifidobactérias (cepas anaeróbicas) foram principalmente afetadas. Comportamento similar foi encontrado por Cenci-Goga et al. (2007), as contagens de *Lactococcus* variaram de 5,34 para 7,16, no dia zero, em salames feitos com a adição de culturas selecionadas de origem láctea.

No momento do consumo a cepa comercial de *L. lactis* (Controle) alcançou a maior contagem de BALs (7,66 Log UFC.g^{-1}), enquanto que a cepa isolada apresentou a contagem de 6,65 Log UFC. g^{-1} . O Tratamento 1 (com os isolados *L. lactis ssp lactis 2* e *Lactobacillus paracasei ssp paracasei 1*), o total de BALs foi de 6,96 Log UFC. g^{-1} .)C.g

UFC.g^{-1} para T2 e 3,45 Log UFC.g^{-1} para T3). Durante o processo estes microrganismos desapareceram devido ao baixo pH e mecanismo de competição. Coliformes fecais, *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva não foram encontrados durante o processo. Portanto, a aplicação de *starters* e probióticos na formulação são mais obstáculos para impedir o crescimento e a sobrevivência das bactérias potencialmente patogênicas, melhorando a qualidade e a segurança do produto final. Os principais grupos microbianos de interesse tecnológico isolados espontaneamente de salames são bactérias ácido lácticas (BALs), *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e *Kocuria* (CORBIERE MOROT - BIZOT, LEROY & TALON, 2006). Além disso, dependendo do produto, outros grupos podem ter um papel a desempenhar, tais como mofos, enterococos e leveduras. BAL e SCN estão ativamente envolvidas no desenvolvimento da textura, cor e sabor; e as BALs também tem um efeito positivo sobre as propriedades higiênicas do produto, inibindo a flora patogênica e deteriorante pela acidificação ou pela produção de antimicrobianos (VILLANI et al., 1994).

A avaliação sensorial pelos painelistas indicou que salames produzidos com cepas probióticas, foram estatisticamente, idênticas entre si em todos os parâmetros analisados, em comparação com o Controle. T1 foi considerado mais aceitável quando a pergunta é cor e aroma, em virtude, talvez, de possuir pH final mais elevado. Uma vez que os consumidores brasileiros são adaptados com sabores e aromas mais suaves e pHs em torno de 5,4 (TERRA, 1998).

Para sabor e textura T1, T2 e T3 foram estatisticamente semelhantes, mas o sabor de T1 foi superior e os valores da textura de T1 e T2 foram os mesmos, porém valores mais elevados que o Controle. *Staphylococcus* e *Kocuria* contribuem para o desenvolvimento da cor, reduzindo nitrito e nitrato para participar no desenvolvimento de sabores de salames (DEMEYER, VERPLAETSE & GISTELINK, 1986; SCHLEIFER, 1986). Eles influenciam a composição de compostos voláteis e não-voláteis, principalmente por degradação de aminoácidos livres e inibindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados livres (HAMMES & HERTEL, 1998; SONDERGAARD & STAHNKE, 2002).

6 CONCLUSÃO

Os leites fermentados analisados continham culturas probióticas capazes de sobreviver às condições do ambiente cárneo do salame e intestinal do ser humano ‘in vitro’.

O meio de cultura elaborado com plasma suíno atendeu as exigências nutricionais das cepas isoladas propiciando suas multiplicações e posteriores utilizações na elaboração de salames tipo Italiano.

Os salames elaborados com as culturas *starters*

7 SUGESTÕES

Sugere-se a realização de pesquisas futuras, dando continuidade a esse estudo, tais como: acompanhar o “shelf-life” do salame probiótico durante 35, 45 e 50 dias; realizar teste de resistência das cepas probióticas aos sais de cura de até 6,0% e verificar a sobrevivência de culturas indesejáveis nos salames probióticos.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional ou de Saúde, Resolução RDC nº 2, 7 de janeiro de 2002.

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

AHRNÉ, S.; NOBAEK, S.; JEPPSSON, B.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A.; MOLIN, G. The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, 88-94, 1998.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION**. Compendium of methods for the microbiological examination of food**. 3. ed. Washington: APHA, 1992.

ANDERSEN, L. Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures. In: 44 ed. **International Commitment of Meat Science and Technology**, Anais. p. 826-827, 1998

ANON. **Lebensmittelverordnung** vom 26. Juni 1995, Stand am 7. Mai 2002 (LMV, SR 817.02). Eidgenössische Druck- und Materialzentrale, Ch-3003 Bern

ARIHARA, K.; ITOH, M. UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 227-230, 2000.

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.

BLANCHETTE, L.; ROY, D. Production of cultured cottage cheese dressing by bifidobacteria. **J. Dairy Sci**., v. 78, p. 1421-1429, 1995.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da fabricação de iogurte. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 42, n. 250, p. 3-8, 1987.

BRASIL, M. A. A. **Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. Publicada no Diário Oficial da União de 02 de janeiro de 2001, Seção I, págs 19 à 22. 2000a.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretária da Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n° 22 de 31 de agosto de 2000**. Aprova Regulamentos Técnicos de

Identidade de Qualidade de Derivados Cárneos. Diário Oficial da União, Brasília, p.15-28, 03 de agosto de 2000b.

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

CANHOS, A. L.; DIAS, E. L. **Tecnologia de Carne Bovina e Produtos Derivados**. Campinas: ITAL, 1985.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 281-370, 2002.

CASABURI, A.; ARISTOY, M-C.; CAVELLA, S.; DI MONACO, R.; 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.

CENCI-GOGA, B. T. et al. Use of starter cultures of dairy origin in the production of Salame Nostrano, an Italian dry-cured sausage. **Meat Science**, doi:10.1016/j.meatsci.2007.07.001. 2007.

CERVO, G. D.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; CIROLINI, A; MILANI, L. I. G.; URNAU, D.; SATOS, B. A.; BALDISSERA, E. M.; REZER, A. P. Isolamento de Bifidobactérias com propriedades probióticas. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 7, 2007, Campinas. **ANAIS:** Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007. CD-ROM.

CHERYA, M. **Ultrafiltration handbook**, Technomic Pub. Co. Inc., Pennsylvania (1986).

CIROLINI, A.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; MILANI, L. I. G.; URNAU, D.; SATOS, B. A; CERVO, G. D.; BALDISSERA, E. M.; REZER, A. P. Isolamento de *Lactobacillus* com propriedades probióticas. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 7, 2007, Campinas. **ANAIS:** Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007a. CD-ROM.

CIROLINI, A.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; MILANI, L. I. G.; URNAU, D.; SATOS, B.A; CERVO, G. D.; BALDISSERA, E. M.; REZER, A. P., PADILHA, V. S.; TREVISAN, A. P. Isolamento e caracterização de *Staphylococcus xylosus* de salames coloniais. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 7, 2007a, Campinas. **ANAIS:** Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, Brasil: Systemica Tecnologia, 2007b. CD-ROM.

COFFEY, A.; RYAN, M.; ROSS, R.P.; HILL, C.; ARENDT, E.; SCHWARZ, G. Use of a broad-host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* transconjugant as an alternative starter for salami manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 231-235, 1998.

CORBIERE MOROT-BIZOT, S.; LEROY, S.; TALON, R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 210-217, 2006.

CRENWELGE, D. D.; DILL, C. W.; TYBOR, P. T.; LANDMANN, W. A. A comparison of emulsification capacities of some protein concentrates. **Journal of Food Science**, v. 39 n. 910, p. 175–177, 1974.

DEMEYER, D.; BLOM, H.; HINRICHSEN, L.; JOHANSSON, G.; MOLLY, K.; MONTEL, M. C., et al. (1995). Interaction of lactic acid bacteria with muscle enzymes for safety and quality of fermented meat products. In **Proceedings of lactic acid bacteria conference** (p. 1-18), Cork, Ireland.

DORFNER, I. E.; GRUYTER, W., New York (1991). In: DEL HOYO, P.; RENDUELES,

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report**. 2001

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization.** Working Group Report. 2002.

FERNÁNDEZ, M.; ORDÓNEZ, J.A.; BRUNA, J. M.; HERRANZ, B.; HOZ, L. Accelarated ripening of dry fermented sausages. **Food Science & Tecnology**, v. 11, p. 201-209, 2001.

FERREIRA, C.L.L. **Productos lácteos fermentados**. Aspectos bioquímicos e tecnológicos. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1987.

FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; HARA, H.; TERADA, A.; MITSUOKA, T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. **Int. J. Food Microbiol**., v. 42, p. 39-44, 1998.

GARCIA-LAFUENTE, A.; ANTOLIN, M.; CRESPO, E.; GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R.; CARAGOL, I. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus paracasei* in a model of bowel inflammation. **Gastroenterology**, v. 116, p. G3833, 1999.

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

GILLILAND, S. E., STALEY, T. E.; BUSH, L. J. Importance of bile tolerance of *Lact. acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 3045-3051. 1984.

GILLILAND, S. E.; REILLY, S. S.; KIM, G. B.; KIM, H. S. Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacterias in a yogurt-like product. **Food Microbiology and Safety**, v. 67, n. 8, p. 3091-3095, 2002

GOLDIN, B.; GORBACH, S. **Probiotics for humans**. In: FULLER, R. Probiotics - the scientific basis (p. 355-376). London: Chapman and Hall. 1992

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 4/5, p. 139-157, 1999.

GORBACH, S.; NAHAS, L.; LERNER, P. Studies of intestinal microflora. In: Effects of diet, age and periodic sampling on numbers of fecal microorganisms in man. **Gastroenterology**, v. 53, p. 845-855, 1967.

GOTTERUP, J. et al., Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. **Meat Science**, doi:10.1016/j.meatsci.2007.07.023. 2007.

GRAND, M.; KÜFEER, M.; BAUMGARTNER, A. Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products. **Eur Food Res Technol.**, v. 217, p. 90-92, 2003.

GRÃS, J. **Plasma proteins**. Lims, Barcelona, Spain, 1983.

GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. New methods for selecting and evaluating probiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, v. 2, p. S242–S247, 2006.

HAMMES, W. Qualitätsmerkmale von starterkulturen. In: Buckenhüskes, H., Editor, 1996. 2. Stuttgarter Rohwurstforum, **Gewürzmüller**, Stuttgart, p. 29-42, 1996.

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

HANSEN, E. B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.119-131, 2002.

HARRIS, E. R. V. **Protein purification methods: A practical approach**, Oxford University, Oxford, UK, 1989.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUISIN'T VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol**., v. 41, p. 85-101, 1998.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotics microorganisms in food and nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 365–373, 2001.

HORN, S. J.; ASPMO, S. I.; EIJSINK, V. G. H. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 5, p. 1082-1089, 2005.

HUGAS, M.; MONFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, v. 59, n. 04, p. 547-554, 1997.

HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; D'HAENE, K.; VANKERCKHOVEN, V.; GOOSSENS, H.; SWINGS, J. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 803-810, 2006.

HYRONIMUS, B.; LE MARREC, C.; HADJ SASSI, A.; DESCHAMPS, A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 61, Issues 2-3 , 1 , p.193-197. 2000

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

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: research and development in Japan. **Food Technol.**, v. 47, p. 126-134, 1993.

ISHIBASHI, N.; YAMAZAKI, S. Probiotics and safety. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 465-470, 2001.

ISOLAURI, E.; RAUTAVA, S.; KALLIOMAKI, M.; KIRJAVAINEN, P.; SALMINEN, S. Role of probiotics in food hypersensitivity. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**; v. 2, p. 263-71, 2002.

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

LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in the presence of acid and bile salts. **Cult Dairy Prod J**, v.30, p. 2-7, 1995.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 55, p. 181-186, 2000.

LIN, W. H.; HWANG, C. F.; CHEN, L. W.; TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products**. Food Microbiology** v. 23, p. 74-81, 2006.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, p. 105-115, 2000a.

LÜCKE, F.K. Fermented meats. In: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, A. C.; GOULD, G.W. (org). The microbiology safety and quality if foods. **Gaitersburg**: Aspen Pobl.,. Cap. 19, p. 420-444, 2000b.

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

MACEDO, R. E. F.; PLANZER JR; S. B.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Características de culturas lácticas probióticas para uso em produtos cárneos fermentados: sensibilidade aos sais de cura e uso de antibióticos para contagem seletiva. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 23, n. 1, jan./jun. 2005

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Curr Pharm Des**, v. 8, p. 99-110, 2002.

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects, **Curr. Pharm. Design,** v. 9, p.175-191, 2003.

MILO OHR, L. Where flavor 'meats' health trend. **Prepared foods**, v. 168, p. 49-50, 1999.

MISRA, A. K.; KUILA, R. K. Use of *Bifidobacterium bifidum* in the manufacture of bifidus milk and its antibacterial activity. **Lait,** v. 72, p. 213-220, 1992.

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

NING, H. N.; WALKER, W. A. Bacterial colonization in the developing gastrointestinal tract: role in the pathogenesis of intestinal diseases. **Bioscience Microflora**, v. 23, p. 55-65, 2004.

OCKERMAN, H. W.; HANSEN, C. L. **Animal by-product processing and utilization**, CRC Press, Florida, USA, 1998.

ORDOÑEZ, J. A. P.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MIGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem animal**. Vol. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279p.

PAPAMANOLI, E., TZANETAKIS, N., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science** v. 65, p. 859-867, 2003.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 1 ed. Goiânia: UFG, v. 2, 1996. 1110 p.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v.67, p.309-317, 2004.

PESTKA, J. J.; HA, C. L.; WARNER, R. W.; LEE, J. H.; USTUNOL, Z. Effects of ingestion of yogurts containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* on spleen and Peyer's patch lymphocyte populations in the mouse. **J. Food Prot.**, v. 64, p. 392-395, 2001.

PETÄJÄ, E.; MANNINEN, T.; SMIDTSLUND, P.; SIPILA, K. Probiotic lactic acid bacteria as starters - applicability in raw ham and fermented meat products made from coarsely ground pork. **Fleischwirtschaft**, v. 83, p. 97-102, 2003.

PRÃNDL, O.; FISCHER, A.; SCHMIDHOFER, T.; SINELL, H. J. **Tecnología e Higiene de la Carne**. Zaragoza: Acribia, 1994. 854 p.

RAVULA, R. R.; SHAH, N. P. Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. **Aus J Dairy Technol,** v.53, p.175-179, 1998.

REBECCHI, A.; CRIVORI, S.; SARRA, P. G.; COCCONCELLI, P. S. Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p.1043-1049, 1998.

REID, G. et al., New scientific paradigms for probiotics and prebiotics, **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 37, p. 105-118, 2003.

ROY, D., DESJARDINS, M. L.; MONDOU, F. Selection of bifidobacteria for use under cheese making conditions. **Milchwissenschaft**, v. 50, p. 139-142, 1995.

ROY, D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p. 167-182, 2001.

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

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties, **J. Biotechnol.**, v. 84, p. 97-215, 2000.

SALMINEN, S.; DEIGHTON, M.; BENNO, Y.; GORBACH, S. Lactic acid bacteria in health and disease (2nd ed.). In: SALMINEN, S. & WRIGHT, A. Lactic acid bacteria (p. 211-254). **New York: Marcel Dekker**. 1998.

SAMESHIMA, T.; BUSTA, F. F.; PETERSON, E. H.; JOHSON, M. G. Colony Count Methods. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. Compéndium of methods for the microbiological examination of foods. 3 ed. Washington: **Amercian Public Health Association**, p. 75-76, 1998.

SAMONA, A.; ROBINSON, R. K. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. **Journal of Society of Dairy Technology**, v. 47, n.2, p. 58-60, 1994.

SAMONA, A., ROBINSON, R. K. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. **J. Soc. Dairy Technol.**, v. 44, p. 64-66, 1991.

SANDERS, M. E.; WALKER, D. C.; WALKER, K. M.; AOYAMA, K.; KLAENHAMMER, T. R. Performance of commercial cultures in fluid milk applications. **J. Dairy Sci.**, v. 79, p. 943-955, 1996.

SANDERS, M. E.; HUIS IN'T VELD, J. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: Microbiological, product, regulatory and labeling issues, **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 293-315M, 1999.

SAS. **Sas Institute Inc**. Cary, NC, 1996.

SCHLEIFER, K. H. Gram positive cocci. In: SNEAT, P.H.A.; MAIR, N.S., & HOLT, J. G. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v 2, p. 999-1003. Williams & Wilkins. 1986.

SHAH, N. P.; LANKAPUTHRA, W. E. V.; BRITZ, M. L.; KYLE, W. S. A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 5, p. 515-521, 1995.

SIQUEIRA, S. **Manual de microbiologia de alimentos**. 1ª edição. Brasília: Embrapa, 1995.

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.

STAHNKE, L. H.; HOLCK, A.; JENSEN, A.; NILSEN, A.; ZANARDI, E. Maturity acceleration of Italian dried sausage by *Staphylococcus carnosus* - relationship between maturity and flavor compounds. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 5, p. 1914-1921, 2001.

TEJADA-SIMON, M. V.; LEE, J. H.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J. J. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. **J. Dairy Sci**., v. 82, p. 649-660, 1999.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de carnes**. São Leopoldo: UNISINOS, 1998. 216 p.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados**: Técnicas de Controle de Qualidade. São Paulo: Nobel, 1988. 121p.

VILLANI, F.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; SALZANO, G.; MOSCHETTI, G.; COPPALA, S. Antimicrobial activity of *Staphylococcus xylosus* from Italian sausages against *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, p.159-161, 1994.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

WALSTRA, P. Physical chemistry of foods, **Marcel Decker Inc**., New York. 2003

WAN, Y.; GHOST, R.; CUI, Z. High resolution plasma protein fractionation using ultrafiltration, **Desalination**, v. 144, p. 301-306, 2002.

ZAYED G.; WINTER J. Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli. **Applied Microbrobiology Biotechnology**, v. 44, p.362-366, 1995.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo