CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Repository Open Access to Scientific Information from Embrapa

Capítulo 8

Desenvolvimento de cultivos iniciadores para o processamento de embutidos cárneos artesanais

Teresinha Marisa Bertol
Ernani Sebastião Sant'Anna
Angela Maria Fiorentini
Maristela Cortez Sawitzki

Introdução

A ciência de agregar valor ao produto é uma das contribuições que colonizadores italianos e alemães trouxeram para a região Sul do Brasil e até hoje permanece a cultura de processamento de alimentos de forma artesanal. Esta produção ainda é realizada de forma empírica, o que resulta em baixa produtividade e risco à saúde do consumidor, uma vez que não existe controle do processo fermentativo.

Desde a antigüidade, o uso de microrganismos em alimentos é praticado pelo homem, mesmo que de uma forma empírica, com o objetivo de conferir ao alimento propriedades sensoriais desejáveis e aumentar o tempo de conservação. Atualmente, a indústria de alimentos utiliza determinados grupos de microrganismos selecionados, com características bioquímicas específicas. Estes microrganismos são denominados de cultivos iniciadores ou culturas starter.

Os componentes mais importantes dos cultivos iniciadores, em produtos cárneos crus, são as bactérias ácido lácticas e as Micrococcaceae, mas também fazem parte de cultivos iniciadores os mofos e leveduras (Hans, 1994). Muitas pesquisas têm demonstrado que a presença de uma microbiota na fermentação de produtos cárneos crus curados é muito importante. De acordo com Smith & Palumbo (1983), a maior função das bactérias lácticas é produzir ácido láctico rapidamente, a partir de açúcar (usualmente glucose) adicionado à massa do produto fermentado, diminuindo o pH do mesmo. Esta capacidade de redução do pH garante o efeito protetor contra microrganismos patogênicos (Staphyloccoccus aureus, Clostridium botulinum e Listeria monocytogenes), aumentando a segurança do produto (Terra, 1998 e Andrighetto et al, 2001). Já as bactérias do grupo Micrococcaceae podem reduzir nitrato e nitrito, também influenciando na qualidade do produto. Estes processos são responsáveis por conferir a cor vermelha característica, e provocar o desdobramento e transformação de proteínas, lipídios e carboidratos, garantindo aroma e sabor característico dos embutidos maturados (Pardi et al., 1996).

Nos últimos anos têm sido realizadas muitas pesquisas referentes a compostos aromáticos isolados de embutidos fermentados. Berdagué et al.(1993) demonstraram que embutidos produzidos com diferentes culturas iniciadoras pertencentes à família Micrococcaceae têm diferentes padrões aromáticos, indicando que eles resultariam em embutidos com diferente perfil sensorial. Além disso, em pesquisa desenvolvida por Tjener et al. (2003), onde foram investigados o crescimento e a produção de aromas em embutidos fermentados com culturas de Pediococcus pentosaceus e Staphylococcus xylosus, foi demonstrada a formação de compostos desejáveis para o sabor dos embutidos maturados. Portanto, a natureza das culturas starter tem uma grande influência na composição volátil e nas características sensoriais contribuindo para o sabor e aroma de embutidos curados (Berdagué, et al., 1993).

Na produção de produtos tradicionais fermentados é importante utilizar culturas iniciadoras provenientes de cepas isoladas de produtos locais, os quais são bem adaptados ao produto específico e à tecnologia específica de produção e assim contribuem para a produção das características sensoriais tradicionais do produto.

Objetivos

O objetivo deste projeto foi desenvolver cultivos iniciadores para a produção de embutidos cárneos, a partir da microbiota isolada de embutidos cárneos artesanais provenientes da Região Noroeste do Rio Grande do Sul, visando a segurança e a qualidade do produto.

Plano de Ação: Identificação molecular de bactérias e obtenção de cultivos iniciadores (bactéria láticas e nitrato redutoras)

Pesquisador responsável: Ernani Sebastião Sant'Anna
Responsáveis por atividades: Angela Maria Fiorentini e Maristela Cortez Sawitzki

Introdução

A identificação da microflora proveniente de lingüiças utilizando-se somente métodos fenotípicos é insuficiente para a caracterização de um microorganismo, pois não é precisa (Blaiotta et al, 2003), devido a uma interpretação ambígua do perfil colorimétrico resultante dos testes bioquímicos (Quere et al, 1997). Por esta razão, métodos moleculares, tais como RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA) (Rossi et al., 2001; Martín et al., 2005), PCR especie-específica (Aymerich et al., 2003; Morot-Bizot et al., 2003; Rantsiou et al., 2005) ou PCR multiplex (Morot-Bizot et al., 2003) têm sido cada vez mais utilizados nos procedimentos de caracterização molecular. Muitos métodos de caracterização tem também sido utilizados para caracterizar os estafilococcus, tais como gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) (Snopkova et al., 1994), gradiente desnaturante em gel de eletroforese (DGGE) de fragmentos do gene 16S RNAr (Cocolin, et al., 2001; Rantsiou, et al., 2005) e amplificação da região intergênica 16S-23S (Rossi et al., 2001; Blaiotta et al., 2003).

Objetivos

O objetivo deste plano de ação foi isolar e caracterizar cepas de Lactobacillus plantarum e de Staphylococcus xylosus provenientes de lingüiças artesanais produzidas na Região Sul do Brasil por meio de

métodos moleculares e fenotípicos, bem como caracterizar seu potencial tecnológico para uso como cultivos iniciadores em salames fermentados.

Resultados e Discussão

Caracterização fenotípica, identificação molecular e propriedades tecnológicas de L. plantarum

No presente estudo, entre 168 cepas de bactérias lácticas isoladas, 127 (75,6%) foram caracterizadas como bactérias ácidos lácticas homofermentativas, gram-positivas e catalase negativas. Entre estas, foram selecionados 10 isolados ao acaso e submetidos à caracterização fenotípica e PCR espécie-específica.

Todas as 10 amostras selecionadas cresceram em pH 3,9 e 9,6 e a 37°C em agar MRS. Quatro cepas (AL2, AP3, AD3 and AM2) cresceram em agar MRS suplementado com 7% de NaCl e uma cepa (C5) cresceu em agar MRS suplementado com 10% de NaCl. Todas as cepas cresceram em agar MRS a 8ºC, mas somente três isolados (C5, AN3 and AM2) cresceram em 45ºC. A habilidade das cepas de crescer em pH 3,9 é um fator importante, porque a principal alteração causada pelas bactérias ácido lácticas em um produto maturado é a redução do pH pela secreção de ácido láctico (Geisen et al., 1992).

Tolerância ao NaCl é outro fator importante na definição de uma cultura iniciadora para produtos fermentados (Rovira et al., 1997). Cepas sensíveis ao NaCl podem ter seu crescimento paralisado quando a concentração de NaCl torna-se muito alta (Ammor et al., 2005).

A interpretação dos perfis de fermentação foi facilitada pelo uso da base de dados API-WEB (BioMérieux) através da percentagem de identificação (% id), que é uma estimativa do perfil da cultura correspondente ao perfil relativo e classe taxonômica de culturas

inscritas na base de dados. Os resultados da caracterização fenotípica sugerem que a cultura referência de L. plantarum e as culturas AJ2, AD3, AN3 e AM2 podem ser classificadas como L. plantarum com uma % id 96,7, a cultura AL2 como L. plantarum com % id = 72 e como L. pentosus com % id = 27,3; as culturas AF5, C5 e AP3 como Pediococcus pentosaceus com identificação ?96,5%, a cultura R2 como L. pentosus com % id = 89,4 e como L. plantarum com % id = 10,4. Uma cultura (AB4) apresentou caracterização fenotípica duvidosa.

Foram conduzidas análises de PCR espécie-específica com primers para L. plantarum para os 10 isolados. Utilizando-se os iniciadores 16/Lpl ou LbP11/LbP12 para amplificação dos fragmentos de DNA, a cultura L. plantarum ATCC 8014 e as sete culturas isoladas (AJ2, AL2, R2, AF5, AD3, AN3 e AM2) foram caracterizadas como L. plantarum, pois foram amplificadas e apresentaram um produto de PCR de 250 pb. Não foram observadas amplificações de fragmentos de DNA das culturas AB4, AP3 e C5 utilizando-se os iniciadores 16/Lpl e também os iniciadores Lbp11/Lbp12. Considerando-se os resultados da caracterização fenotípica e da caracterização molecular, entende-se que as culturas AB4, AP3 e C5 não se caracterizam como culturas L. plantarum. Não foram observadas amplificações do DNA de qualquer dos isolados quando utilizados os iniciadores 16/Lpe, os quais são específicos para L. pentosus.

As sete culturas caracterizadas como L. plantarum no estudo fenotípico e molecular foram também avaliadas quanto a sua capacidade de crescimento, estabilidade no armazenamento, capacidade para produção de D – ou L – ácido láctico, atividade nitrato redutase e atividade antagonística. Todas as culturas produziram a forma racêmica DL-ácido láctico, em média 67,23% do isômero L e 32,76% do isômero D. Nenhuma das culturas avaliadas apresentou atividade nitrato redutase. Todas as culturas apresentaram estabilidade no armazenamento a –20°C e todas exibiram atividade antagonística

contra L. monocytogenes NTC 098630. Quatro culturas inibiram o crescimento de S. aureus ATCC 12598 e S. xylosus ATCC 29971, três culturas inibiram o crescimento de uma linhagem de S. xylosus isolada, mas nenhuma cultura inibiu a cultura padrão de E. coli ATCC 25922.

Caracterização fenotípica, identificação molecular e propriedades tecnológicas de S. xylosus

De um total de 175 cepas Micrococcaceae isoladas de salames naturalmente fermentados, 89 (50,8%) foram catalase-positivas e coagulase negativas. Destas, 25 linhagens foram escolhidas aleatoriamente e submetidas ao sistema API-STAPH para caracterização fenotípica. Vinte e uma (84,0%) das 25 linhagens foram identificadas como Staphylococcus spp, uma (4,0%) foi identificada como Kocuria varians e três (12,0%) apresentaram perfil duvidoso. Em relação às linhagens identificadas como Staphylococcus, S. xylosus foi a espécie dominante (42,8 %), seguida pela S. saprophyticus (28,5%), S. lentus (19,0%), S. epidermidis (4,7%) e S. warneri (4,7%).

A maior parte das cepas identificadas como S. xylosus apresentou as características típicas da espécie, tais como capacidade para redução de nitrato (88,8%), produção de acetoína (77,7%) e produção de ácido a partir de xilose (77,7%) e manose (88,8%), mas não a partir de rafinose (11,1%).

A primeira regra para seleção de cepas utilizando-se culturas iniciadoras é a capacidade para reduzir nitrato, por causa de sua influência na formação da cor (Garcia-Verona et al., 2000), mas a produção de acetoína e a atividade da urease também devem ser consideradas. No presente estudo, as linhagens identificadas como S. xylosus apresentaram características desejáveis de acordo com Drosinos et al. (2007): atividades de nitrato redutase e urease e produção de acetoína. De acordo com Smith & Palumbo (1983), a tolerância ao NaCl e $NaNO_2$ e a capacidade para crescimento entre 27°C e 43°C também são importantes características. As linhagens testadas no presente estudo

apresentaram atividades catalase positiva e coagulase negativa, crescimento em 15°C e 45°C, em diferentes concentrações de NaCl (10% e 15%) e em diferentes pHs (5,0 e 5,5) em caldo BHI.

As linhagens não apresentaram alterações no crescimento em substrato sólido (agar BHI) sob diferentes concentrações de NaCl, mostrando tolerância a uma concentração de 3% deste sal. A maior parte das cepas também toleraram a concentração de 200 ppm de NaNO2, o qual não influenciou seu crescimento. Também não houve prejuízo ao seu crescimento quando NaCl e NaNO2 foram utilizados simultaneamente, demonstrando tolerância apropriada.

Para conduzir a caracterização molecular das linhagens de S. xylosus, foram selecionadas nove linhagens de S. xylosus e uma linhagem de S. epidermidis, as quais foram submetidas a análise de PCR espécie-específico. Nove das 10 linhagens apresentaram o fragmento esperado quando os primers TstaG422/Tstag765 foram usados, confirmando que as culturas isoladas pertenciam ao gênero Staphylococcus.

Somente duas linhagens (AD1 e AD5) confirmaram pertencer a espécie S. xylosus, uma vez que estas foram as únicas em que observou-se o produto esperado de PCR de 539 pb. As outras linhagens não apresentaram qualquer fragmento, sugerindo que elas pertencem a outra espécie de Staphylococcus.

As duas linhagens que foram confirmadas como S. xylosus na caracterização fenotípica e molecular foram também avaliadas quanto a sua estabilidade no armazenamento, produção de enterotoxinas e atividade antagonística. Estas linhagens apresentaram crescimento significativo em caldo BHI e boa estabilidade ao processo de liofilização e conservação depois de 1 mês ou 6 meses de armazenamento a -20°C. Além disto, não foram encontradas enterotoxinas estafilocócicas nestas linhagens. Por último, estas duas linhagens não exibiram atividade antimicrobiana contra os seguintes microrganismos: L. monocytogenes NTC 098630, E. coli ATCC 25922, S. Aureus ATCC

12598, L. plantarum ATCC 8014 e uma linhagem isolada de L. plantarum.

Conclusões

Os resultados deste trabalho demonstram a importância dos métodos moleculares para identificação dos isolados ao nível de espécie, pois permitiram uma identificação precisa das linhagens de L. plantarum e S. xylosus. A presença destas espécies entre a flora indígena das lingüiças fermentadas produzidas na Região Sul do Brasil indica uma boa capacidade de adaptação neste tipo de produto.

As cinco linhagens (AJ2, AL2, AD3, AN3 e AM2) isoladas de lingüiças artesanais e identificadas como L. plantarum apresentam potencial para serem utilizadas como cultivos iniciadores para salames fermentados. As mais promissoras para uso simples são a AL2, AD3 e AM2, por serem tolerantes ao sal. Porém, a AJ2 , R2 e AM2 apresentam melhor potencial para uso em associação com S. xylosus devido a ausência de atividade antagonística contra esta espécie.

As duas linhagens (AD1 e U5) isoladas de lingüiças artesanais e identificadas como S. xylosus, demonstraram atividades nitrato redutase e catalase, crescimento satisfatório na presença de NaCl e NaNO2, habilidade para reduzir nitritos, ausência de atividade antagônica em relação a bactérias ácido lácticas e ausência de produção de enterotoxinas, sendo recomendadas como cultivos iniciadores simples ou associados com bactérias lácticas, para utilização na produção de salames fermentados.

Plano de Ação: Caracterização microbiológica, físico-química e sensorial de salames processados com fermentos cárneos

Pesquisador responsável: Teresinha Marisa Bertol
Responsáveis por atividades: Angela Maria Fiorentini e Maristela Cortez Sawitzki

Introdução

A inoculação da massa de salame com cultivos iniciadores selecionados por suas propriedades tecnológicas promove a segurança e a qualidade do produto. Em uma mistura de microrganismos, as bactérias ácido lácticas tem a função de promover a estabilidade microbiana e de imprimir propriedades tecnológicas desejáveis no produto final em razão da produção dos ácidos láctico e acético e a conseqüente queda do pH (Drosinos et al., 2007). Por outro lado, algumas linhagens de Staphylococcus coagulase-negativo, como S. xylosus e S. carnosus, podem ser utilizados para promover o sabor dos produtos cárneos fermentados (Berdagué et al., 1993). Estes tem a função principal de promover a redução dos nitratos e interferir na lipólise e proteólise, influenciando assim a cor e o flavor do produto.

Do estudo prévio em que fez-se a caracterização fenotípica e a identificação molecular de linhagens de S. xylosus e de L. plantarum isoladas da microbiota de embutidos fermentados naturalmente, bem como para avaliação de suas propriedades tecnológicas, foram selecionadas as linhagens S. xylosus U5 e L. plantarum AJ2. Estas linhagens foram selecionadas em virtude do seu potencial tecnológico para uso como cultivo iniciador em embutidos fermentados.

Objetivos

O objetivo deste plano de ação foi investigar o efeito dos cultivos iniciadores S. xylosus U5 e L. plantarum AJ2 sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do salame tipo Milano.

Resultados e Discussão

Efeito do S. xylosus

No grupo inoculado com S. xylosus, as contagens de cocos Gram positivo, catalase positivo-Staphylococcus Coagulase-negativo (SCN) mostraram considerável crescimento durante a maturação, de 7,60 log UFC.g-1 na contagem inicial, até valores de 9,84 log UFC.g-1 após 14 dias. No grupo não inoculado (controle) esses microrganismos foram encontrados em concentrações muito baixas na contagem inicial, e depois de 14 dias alcançaram valores de 6,95 log UFC.g-1.

Coliformes totais e termotolerantes (< 3 NMP) foram semelhantes em ambos os grupos. Entretanto, nas amostras inoculadas com S. xylosus, o número destes microrganismos diminuiu nitidamente e, depois de 7 dias de maturação, nenhuma célula viável de coliformes totais e termotolerantes foi detectado. Por outro lado, no controle, coliformes totais e termotolerantes estiveram presentes após o 7º dia, e só não foram detectáveis depois de 21 dias de maturação, estando ausentes no produto final. Bolores e leveduras não apresentaram nenhuma função significativa nos embutidos, estiveram presentes a níveis máximos de cerca de 2,77 log UFC.g-1 e, na maioria dos casos, não foram detectados.

Ambos os grupos estavam livres de Salmonella e Listeria após a formulação, como também de Clostridium sulfito redutores (< 1) e Staphylococcus coagulase positivo (< 2) durante a maturação e no produto final.

Durante a maturação, o pH não variou entre os grupos inoculado e não inoculado, provavelmente por causa das baixas contagens de bactérias ácido lácticas e do reduzido efeito das linhagens de Staphylococcus no desenvolvimento do pH nos embutidos. Inicialmente, o pH de ambos os grupos estava em torno de 5,6 e, então, após 7 dias de maturação, diminuiu para 5,2. Foi observado um leve aumento do pH no produto final, com valores ao redor de 5,3. Isto poderia ser atribuído à produção de amônia e outros compostos tais como peptídeos, aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos graxos livres oriundos da atividade proteolítica (Mauriello et al., 2004).

A atividade de água (aw) e umidade mostraram uma diminuição constante durante a maturação, enquanto que proteína, gordura, cinza, NaCl, Na e Fe aumentaram o teor durante a maturação em conseqüência da desidratação ocorrida no produto.

Nitrato e nitrito curam e preservam carnes. O nitrato não apresenta atividade antioxidante, mas torna-se funcional na redução de nitritos (Terra et al., 2004). Assim, durante a preparação, nitrato é reduzido a nitrito, que é o principal ingrediente ativo nessas misturas de sais de cura (Cammack et al., 1999). Nitratos e nitritos diminuíram em concentração durante a fermentação e maturação do salame, sendo que dos 7 aos 28 dias a redução foi mais acentuada ($P<0,05$) no salame inoculado com S. xylosus em relação ao controle. Atribui-se essa diferença ao S. xylosus, pois estudos mostraram que esta espécie possui uma boa habilidade para reduzir nitrato a nitrito, pela ação da enzima nitrato redutase (Montel et al., 1996; Talon et al., 1999; Mauriello et al., 2004; Fiorentini et al., 2007).

Durante a maturação foram observados baixos valores de peróxidos no grupo inoculado em relação ao grupo controle, demonstrando a atividade da catalase da linhagem S. xylosus U5 (catalase positivo). A oxidação conduz à formação de peróxidos e os mesmos são reduzidos quando estão presentes microrganismos com alta atividade de catalase (Varnan & Sutherland, 1995).

Em ambos os grupos houve um aumento progressivo na produção de ácidos graxos livres com o transcorrer do período de maturação, porém, apenas pequenas diferenças não significativas puderam ser observadas entre os tratamentos ($P>0,05$). Mesmo considerando que linhagens de Staphylococcus são a principal causa da lipólise em embutidos fermentados (Samelis et al., 1993), os valores indicam que a cultura S. xylosus U5 não desenvolveu ação significativa nas transformações químicas dos ácidos graxos livres. Mesmo que a linhagem S. xylosus U5 tenha apresentado atividade lipolítica (Fiorentini et al., 2007), nas condições do presente estudo pouca atividade foi demonstrada.

Quanto aos parâmetros de cor obtidos no salame, o grupo inoculado mostrou valores mais elevados ($P<0,05$) de L*, a* e b* em relação ao controle, provavelmente pela ação enzimática da linhagem de S. xylosus U5. Esta ação envolve a atividade bacteriana de nitrato redutase que conduz à formação de nitrosomioglobina (Talon et al., 1999).

A avaliação sensorial indicou a preferência para o salame inoculado (72,5%) em relação ao controle. A linhagem S. xylosus U5 possui um perfil enzimático comprovado capaz de promover propriedades sensoriais desejáveis no salame, as quais interferem na aceitabilidade do produto.

Efeito do L. plantarum

No salame inoculado com L. plantarum AJ2, a população de bactérias ácido lácticas aumentou de forma mais acentuada ($P<0,05$) do que não inoculado (valor médio de 8,54 0,23 log UFC.g-1e 6,52 0,12 log UFC.g-1, respectivamente) até o final do processo de maturação. Isto indica que a cultura de L. plantarum AJ2 apresentou potencial para se desenvolver no salame tipo Milano. A população natural de bactérias ácido lácticas, próxima a 4,5 log UFC.g-1 pode ser insuficiente no processo fermentativo, porque, conforme Smith e Palumbo (1983), é

necessária a adição de microrganismos desejáveis em produtos cárneos fermentados, na concentração de 7,0 a 9,0 log UFC.g-1 para inibir os microrganismos indesejáveis e prevenir ou reduzir falhas na fermentação.

Não foi observado potencial risco da presença de microrganismos deteriorantes, patogênicos e/ou toxigênicos em qualquer dos produtos (inoculado e não inoculado).

A composição química aos 42 dias de fermentação e maturação, dos salames inoculados com L. plantarum não diferiu ($P > 0,05$) daquela dos salames não inoculados. Porém, o pH decresceu de forma mais acentuada ($P < 0,05$) nos primeiros 7 dias de fermentação e a acidez aos 42 dias foi maior ($P < 0,05$) nos salames inoculados em comparação com o controle (não inoculado). A habilidade das bactérias ácido lácticas, em particular os Lactobacillus, para reduzir o pH, previne o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes nos produtos cárneos, promovendo a segurança e o maior tempo de armazenagem do produto (Lücke, 1985; Samelis et al., 1993). Um rápido decréscimo do pH para valores próximos de 5,3 é importante para a inibição de Salmonella e S. aureus em produtos fermentados quando em temperatura próxima de 18ºC (Schillinger & Lücke, 1987).

Aos 42 dias de maturação, os níveis de nitratos e nitritos residuais foram mais baixos ($P < 0,05$) e a cor apresentou-se com maior intensidade de brilho e coloração vermelha no salame inoculado com L. plantarum em comparação com o controle. Considera-se que as condições de pH no salame inoculado contribuíram para este fato.

O perfil de ácidos graxos livres não foi influenciado pela inoculação com L. plantarum. Por outro lado, os valores estimados de peróxido e TBARS aumentaram ($P < 0,05$) em ambos os grupos durante o período de maturação, porém, aos 42 dias de maturação, o salame inoculado apresentou menores valores para estes compostos comparado ao

salame controle. Estes resultados sugerem que a cultura L. plantarum AJ2 produziu efeito positivo na estabilidade oxidativa dos lipídios.

Na avaliação sensorial o salame inoculado obteve maior preferência dos provadores (60,71%) do que o salame controle. Esse resultado sugere que a cultura de L. plantarum AJ2 promoveu propriedades organolépticas desejáveis no salame.

Os resultados das análises microbiológicas no produto final estão de acordo com a legislação brasileira para os padrões microbiológicos de produtos cárneos maturados (Brasil, 2001). Além disto, a composição química e o conteúdo de nitritos e nitratos residuais no produto acabado (42 dias), estão de acordo com a legislação brasileira - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de salame tipo Milano (Brasil, 2000).

Conclusões

As linhagens de S. xylosus U5 e L. plantarum AJ2 apresentaram adequado crescimento durante a fermentação e maturação do salame tipo Milano. Os parâmetros de cor foram superiores e os níveis de nitritos e nitratos residuais foram inferiores nos salames inoculados, sendo estes os produtos preferidos pelos degustadores.

Ambas as linhagens podem ser utilizadas como cultivos iniciadores simples em embutidos fermentados ou, como sugere a ausência de antagonismo entre ambas, em uso combinado.

Referências

AMMOR, S.; RACHMAN, C.; CHAILLOU, S.; PRÉVOST, H.; DOUSSET, X.; ZAGOREC, M.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small scale facility producing traditional dry sausages. Food Microbiology., v.22, p.373-382, 2005.

ANDRIGUETTO, C.; ZAMPESE, L.; LOMBARDI, A. RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meats plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). Letters in Applied Microbiology, v.33, p. 26-30, 2001.

AYMERICH, T.; MARTÍN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. Applied in Environmental Microbiology, v.69, p.4583-4594, 2003.

BERDAGUÉ, J.L.; MONTEIL, P.; MONTEL, M.C.; TALON, R. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. Meat Science, v.35, n.3, p. 275-287, 1993.

BLAIOTTA, G.; PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; MOSCHETTI, G.; VILLANI, F. Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNAV3 region and 16S-23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of staphylococci from Italian fermented sausages. Systematic Applied Microbiology, v.26, p.423–433, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA/ Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 22 de 31 de julho de 2000: Anexo V – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis>. Acesso em 14 de abril 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde - MS/Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução Nº 12 de 02 de janeiro de 2001 – Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis> Acesso em 06 de março de 2007.

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

CAMMACK, R.; JOANNOU, C. L.; CUI, X-Y.; MARTINEZ, C. T.; MARAJ, S. R.; HUGHES, M. N. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. Biochimica et Biophysica Acta, v.1411, p.475-488, 1999.

COCOLIN, L.; MANZANO, M.; AGGIO, D.; CANTONI, C.; COMI, G. A novel polymerase chain reaction (PCR) – denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages. Meat Science, v.58, p.59–64, 2001.

DROSINOS, E.H.; PARAMITHIOTIS, S.; KOLOVOS, G.; TSIKOURAS, I.; METAXOPOULOS, I. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. Food Microbiology, 24: 260-270, 2007.

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

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

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

HANS, J. S. Microbiologia de los produtos cárnicos. In: PRANDL, O.; FISCHER, A.; SCHIMIDTHOFFER, A. Tecnologia e higiene de la carne. Zaragoza: Acríbia, 1994. p. 641-667.

JESSEN, B. Starter cultures for meat fermentation. In: CAMPBELL, P.; COOK, P.E. Fermented meats. London: Blackwell Academic Professional, 1995. p.130-159.

LÜCKE, F.K. Fermented sausages. In: Wood, B.J.B. Microbiology of Fermented Foods. London and New York: Elsevier, 1985. p.41-83.

MARTÍN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; AYMERICH, T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, v.107, n.2, p.148-158, 2005.

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

MONTEL, M.C.; TALON, R.; BERDAGUÉ, J.L.; ROUSSET, S. Biochemical activities of Micrococcaceae and their effects on the aromatic profiles and odours of dry sausages model. Food Microbiology, v.13, p.489-499, 1996.

MOROT-BIZOT, S.; TALON, R.; LEROY-SETRIN, S. Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of Staphylococcus xylosus, a species used in food fermentation. Journal of Microbiological Methods, v.55, p.279-286, 2003.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. Ciência, higiene e tecnologia da carne. Goiânia:CEGRAF:UFG, 1996. v.2, 1110p.

QUERE, F.; DESCHAMPS, A.; URDACI, M.C. DNA prove and PCR-specific reaction for Lactobacillus plantarum. Journal of Applied Microbiology, v.82, p.783-790, 1997.

RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; COMI, G.; COCOLIN, L. Ecology and characterization by molecular methods of Staphylococcus species isolated from fresh sausages. International Journal of Food Microbiology, v.97, p.277-284, 2005.

ROSSI, F.; TOFALO, R.; TORRIANI, S.; SUZZI, G. Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of Staphylococcus xylosus strains from dry sausages. Journal of Applied Microbiology, v.90, p.365–371, 2001.

ROVIRA, A.; NIETO, J.C.; RODRIGUEZ, A.; REGUERA, J.I.; GONZÁLES, Z. Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages. Microbiology, v.13, p.201-208, 1997.

SAMELIS, J.; AGGELIS, G.; METAXOPOULOS, J. Lipolytic and microbial changes during the natural fermentation and ripening of Greek dry sausages. Meat Science, v.35, p.371–385, 1993.

SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.K. Identification of lactobacilli from meat products. Food Microbiology, v.4, p.199-208, 1987.

SMITH, J.L.; PALUMBO, S.A. Use of Starter Cultures in Meats. Journal of Food Protection, v.46, n.11, p.997-1006, 1983.

SNOPKOVA, S.; GÖTZ, F.; DOSKAR, J.; ROSYPAL, S. Pulse-field gel electrophoresis of the genomic restriction fragments of coagulase-negative staphylococci. FEMS Microbiology Letters, v.124, p.131–140, 1994.

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

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

TERRA, A.; FRIES, L.; TERRA, N. Particularidades na fabricação do salame. São Paulo: Varela, 2004, 152 p.

TJENER, K.; STAHNKE, L.H.; ANDERSEN, L.; MARTINUSSEN, J. A fermented meat model system for studies of microbial aroma formation. Meat Science, v.66, p.211-218, 2003.

VARNAN, A.; SUTHERLAND, J. Embutidos Fermentados. In: VARNAM, A.H. Carne y productos cárnicos, tecnologia, química e microbiologia. Zaragoza: Acríbia, 1995. p. 307-345.