

(S3-P125)

SALICÓRNIA COMO PRODUTO FERMENTADO: DESENVOLVIMENTO DE CONDIÇÕES ÓPTIMAS PARA UM PROCESSO CONTROLADO

MARIA F. DE J-RAPOSO, JOSÉ V. SILVA, MARGARIDA NERI e
RUI M. S. C. MORAIS*

Escola Superior de Biotecnologia - Universidade Católica Portuguesa
Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto, Portugal

* e-mail: rmmorais@esb.ucp.pt; telef.: +351 22 5580050; fax: +351 22 5090351

Palavras chave: cultura de arranque - fermentação láctica - *Lactobacillus plantarum* - *Leuconostoc mesenteroides* - *Pediococcus acidilactici* – salicórnica

RESUMO

Com o intuito de desenvolver um produto fermentado à base de rebentos de salicórnica conduziu-se esta experiência para monitorizar o processo fermentativo. Os dados inicialmente obtidos por caracterização fenotípica revelaram a inexistência de bactérias do ácido láctico na flora indígena da planta. Consequentemente, optou-se pela utilização de culturas de arranque, tendo-se monitorizado as condições de pH, acidez titulável e salinidade em soro de couve estéril, com e sem salicórnica, quando expostas a diferentes bactérias fermentativas: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus acidilactici*. Apenas se verificaram alterações significativas no processo fermentativo com a introdução da salicórnica no caso da fermentação com *L. plantarum*, tendo-se observado um aumento significativo na variação do pH e da % de ácido láctico, no decorrer do processo, e comparativamente com as restantes estirpes. Os resultados obtidos para a acidez titulável são satisfatórios já que foi detectado, aproximadamente, 1 % de ácido láctico como resultado da actividade fermentativa nas diferentes culturas de arranque. A espécie predominante no final da fermentação foi *L. Plantarum*, sendo esta a que produziu maior percentagem de ácido láctico.

SALICORNIA AS A FERMENTED PRODUCT: DEVELOPMENT OF AN OPTIMISED PROCEDURE FOR A CONTROLLED PROCESS.

Key-words: starting cultures - lactic fermentation - *Lactobacillus plantarum* - *Leuconostoc mesenteroides* - *Pediococcus acidilactici* - salicornia - pickleweed

ABSTRACT

In order to develop a fermented product with young stems of salicornia/pickleweed, an experiment was worked out and the fermentative process was studied. Initial data on the bacterial fauna of the plants revealed the existence of no lactic acid bacteria. Therefore, we chose to use of starting cultures. Sterile “heart cabbage” juice was the base for different fermentative bacteria: *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, and pH, titrated acidity and salinity were evaluated. The same experiment was undertaken with and without the glasswort or salicornia. Significant differences were

observed only with *L. plantarum*: pH variation and percentage of lactic acid suffered a significant increase during the fermentative process, specially when salicornia was introduced in the juice. Results obtained for the titrated acidity were also good, since approximately 1% lactic acid was detected, as a result of the fermentative activity in the different starting cultures. Predominant species by the end of the fermentation was *L. plantarum*, being the one that produced higher quantities of lactic acid.

INTRODUÇÃO

A fermentação é uma das técnicas mais antigas de conservação de alimentos. Várias fermentações, particularmente lácticas, têm sido alvo de estudo ao longo dos anos (Pederson e Albury, 1969; Stamer et al., 1969; Stamer et al., 1971; Abdel Gadir et al., 1983). A que mais se destaca nestes estudos é a produção de chucrute. Devido ao sucesso da fermentação deste produto, muitos outros vegetais passaram a ser fermentados, como pepinos, beterrabas, couve-flor, mistura de vegetais (kimchi) (Abdel Gadir et al., 1983; Fleming et al., 1983), aipo e rabanetes (Bates e Matthews, 1971), e cenouras (Bates e Matthews, 1971; Niketic-Aleksic et al., 1973; Fleming et al., 1983). Porém, não existem referências de produtos fermentados à base de salicórnia.

As bactérias lácticas usadas nas fermentações de vegetais fazem parte da flora indígena da própria planta. Estas fermentações espontâneas levam, no entanto, a variações nas qualidades finais do produto (Untereiner, 1989). Contudo, está provado que o uso de culturas de arranque ajudam a padronizar o produto final (Font de Valdez et al., 1990).

A produção de chucrute revela uma sequência microbiana típica, que envolve bactérias do ácido láctico heterofermentativas e homofermentativas. Nos primeiros estágios predominam espécies de *Leuconostoc*, uma vez que promovem as condições anaeróbias com o pH inicial; posteriormente, actuam espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Font de Valdez et al., 1990). Inicialmente, as espécies de *Leuconostoc* usam a glucose e a frutose para o crescimento, resultando na produção de ácido láctico, ácido acético, etanol, manitol e CO₂ (heterofermentativas), que é acompanhado por um rápido decréscimo de pH. Durante a segunda fase, as bactérias homofermentativas continuam a fermentação até um pH de 3.5 a 3.8. Uma fermentação espontânea geralmente precisa de 4 a 6 dias para o pH estabilizar. No entanto, uma concentração inicial de inóculo elevada (10⁶ – 10⁷ CFU/mL) de uma mistura de culturas de arranque pode controlar e acelerar o processo no sentido de prevenir a degradação, obtendo-se assim produtos de elevada consistência e qualidade (Aukrust et al., 1994).

A salicórnia é uma planta halófila que pode ser encontrada em Portugal, principalmente na região do Sopal (Algarve) e Aveiro (Davy et al., 2001; Assis et al., 2004). A salicórnia é rica em substâncias diuréticas, depurativas e resolutivas. Possui também elevadas quantidades de iodo, fósforo, cálcio, sílica, zinco, manganésio e vitaminas A, C e D (http://plantes.sauvages.free.fr/pages_plantes/plante_salicorne.htm) . As paredes das suas células são ricas em arabinose, ácido galacturónico, glucose, proteínas e contêm ainda ácido ferúlico e acético (Renard et al., 1993).

Visto estar provado que o soro de couve estéril é um substituto satisfatório da couve (Stamer et al., 1971), adaptou-se o modelo de produção de chucrute, recorrendo a culturas de arranque com *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus acidilactici* para desenvolver um produto fermentado com rebentos de salicórnia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

As espécies bacterianas *Lactobacillus plantarum* (homofermentativa facultativa), *Leuconostoc mesenteroides* (heterofermentativa obrigatória) e *Pediococcus acidilactici* (homofermentativa) foram isoladas e gentilmente cedidas pela Prof. Doutora Paula Teixeira (ESB). As culturas puras foram mantidas em MRS agar. Todos os meios de MRS usados neste trabalho são da Pronadisa Laboratoires.

As plantas de salicórnia (*Sarcocornia fruticosa*) foram produzidas por micropropagação no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Pós-colheita (do CBQF-ESB) e mantidas em câmara de fitoclima do tipo “walk-in”, a temperatura constante (25°C) e iluminação contínua (29,18 $\mu\text{Es}^{-1} \text{m}^{-2}$); as sementes foram obtidas de plantas das salinas do Algarve.

Caracterização fenotípica de isolados

Para analisar a existência de bactérias do ácido láctico na flora indígena da planta, foram adicionados 10 g de salicórnia não estéril, a 90 mL de água estéril e homogeneizados num stomacher (A.J. Seward, London, England), durante 5 minutos à velocidade normal.

Efectuaram-se diluições decimais e procedeu-se à enumeração de bactérias por contagem em placa em meios de MRS agar, M17 agar e APT agar, com diferentes concentrações de NaCl. As placas foram incubadas durante 3 dias, a 30°C e 37°C, em condições de microaerofilia e aerofilia.

De forma a confirmar a presença de bactérias lácticas, os isolados obtidos foram analisados pela sua morfologia celular, coloração de Gram, produção de catalase e teste de oxidase.

Preparação do soro de couve

O soro de couve foi preparado com couves coração obtidas no comércio local. As couves frescas foram lavadas, cortadas em pequenos pedaços e foi adicionado NaCl de forma a atingir-se uma concentração de sal de 2,5 % (m/m). Posteriormente, homogeneizou-se a mistura com o auxílio de um triturador (Torrax, T25 basic, IKA Labortechnik). A polpa obtida sofreu uma pré-filtração com uma rede com cerca de 1 mm de porosidade. O soro pré-filtrado foi centrifugado a uma velocidade de 10.000 rpm, durante 10 minutos, a 5 °C (Sorvall instruments Du Pont – RC 5C). Após separação dos resíduos de polpa, dividiu-se o soro em frascos com volumes de 200 mL e esterilizou-se em autoclave. Posteriormente, os rebentos de salicórnia estéril foram inseridos nos frascos de fermentação, contendo o soro, na proporção de 2:100 (m/v) e foram mantidos durante 5 dias a 30°C. Foram também realizadas fermentações sem salicórnia (controlo).

No decorrer da fermentação, foram retiradas amostras a intervalos regulares de tempo para determinação de pH, acidez total e percentagem de sal, e enumeração de bactérias lácticas totais em MRS agar. As placas foram incubadas durante 48 h a 37°C em condições de microaerofilia.

Preparação do inóculo

Na preparação do inóculo para a fermentação, as culturas puras de *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus acidilactici* foram incubadas em MRS agar durante 2 dias a 30°C. Uma única colónia foi usada para inocular 100 mL de caldo de MRS, que foi incubado durante 24 h a 30°C. Em seguida, inoculou-se 2 mL deste caldo nos recipientes de fermentação de 200 mL.

Análises químicas

A acidez titulável foi determinada pela titulação de 10 mL da amostra de soro diluída em 10mL de água destilada com uma solução de NaOH 0,1M, usando com indicador fenolftaleína 0,5 %. Um ml de NaOH 0,1 M foi tido como equivalente a $9,008 \times 10^{-3}$ g de ácido láctico. (Amoa-Awua et al., 1996). A medição do pH (micro pH 2001, Crison) foi efectuada em amostras de 10 mL. A quantificação da percentagem de NaCl ao longo da fermentação foi efectuada com salinómetro (ES – 421, Atago). Todas as determinações foram efectuadas em duplicado.

RESULTADOS

Sendo a salicórnia uma planta com elevado teor de sal na sua constituição, aquando do procedimento para a caracterização fenotípica dos isolados da sua flora normal, foram utilizados meios com diferentes concentrações de NaCl, com o intuito de prevenir a inibição do crescimento dos microrganismos característicos, ou seja, minimizar um factor limitante do crescimento microbiano. Por análise da figura 1 verifica-se que as três espécies, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* e *Leuconostoc mesenteroides* bactéria mais resistente ao abaixamento do pH. apresentam uma concentração celular máxima ao fim de 30 h de fermentação, seguida de um decréscimo que ocorre em simultâneo com um abaixamento do pH (gráficos A, C e E). Esse decréscimo é mais evidente nas culturas de *P. acidilactici*; *L. plantarum* parece ser a bactéria mais resistente ao abaixamento de pH.

A presença de salicórnia durante o processo fermentativo (gráficos B, D e F) não parece influenciar o crescimento microbiano, que parece desenvolver-se de forma muito semelhante, ao nível de cfu/ mL e pH.

Dado que o trabalho visava uma fermentação láctica, monitorizou-se a produção de ácido láctico ao longo da fermentação, para as três espécies estudadas (figura 2).

Na figura 2 verifica-se, tal como seria de esperar, um aumento da percentagem de ácido láctico, ao longo do tempo, sendo esse aumento bastante significativo nas culturas com *L. plantarum*. As diferenças entre *L. mesenteroides* e *P. acidilactici* não são significativas. Na verdade, a percentagem em ácido láctico nas culturas destas duas últimas bactérias reflecte o facto do crescimento ter sido, de certo modo, inibido depois das primeiras 30h de fermentação.

Comparando os casos A e B (figuras 1 e 2), verificámos uma maior variação de pH e maior produção de ácido láctico em B ou seja, na presença de salicórnia.

Equiparando os casos C e D, E e F (figuras 1 e 2), para as fermentações com salicórnia, verificam-se menores variações de pH e de percentagem de ácido láctico, entre o início e o final da experiência. Ou seja, as estirpes presentes, nas mesmas condições de crescimento apresentam um comportamento diferente do de *L. plantarum*, sendo este microrganismo o que, entre os três, apresenta a maior variação das condições testadas.

A quantificação do NaCl ao longo da fermentação revelou que a percentagem deste sal se mantém constante no soro e igual 2,5%.

DISCUSSÃO

Os dados resultantes revelaram a inexistência de bactérias do ácido láctico na flora indígena da salicórnia, já que as plantas tinham crescido por micropropagação, em ambiente estéril. Por isso, e também porque não era possível concluir sobre a flora bacteriana autóctone das plantas no seu habitat natural, optou-se pela utilização de culturas de arranque, crescidas em soro estéril de couve, método que permite um maior controlo do processo e da qualidade padronizada.

Realizou-se simultaneamente uma fermentação espontânea unicamente, para verificar se o soro de couve seria fermentável, o que se verificou.

Tal como seria de esperar, confirmou-se o carácter ácido do processo fermentativo. A concentração em bactérias lácticas (LAB) no produto fermentado, tanto simples como com salicórnia, chegou a atingir 10^8 - 10^9 CFU/ ml, nas primeiras 30-36 horas, mas a população decresceu até 10^5 - 10^6 , nomeadamente com *L. mesenteroides* e *P. acidilactici*. Resultados semelhantes foram referenciados por Gardner et al. (2001), Huhert e Dupuy (1994) e Fleming et al. (1985). Contudo, e tal como aconteceu com Gardner et al. (2001), verificaram-se variações nas contagens, entre 1-3 logs CFU/ ml.

A estabilização do pH, embora só se tenha verificado após as primeiras 40 horas de fermentação, está de acordo com a observada por Gardner et al. (2001), apesar de mostrar valores inferiores com *L. plantarum*, onde se verificou a maior percentagem de ácido láctico.

Tendo em conta os dados obtidos e verificada a relação directa entre pH e acidez titulável, pode concluir-se que ocorre uma reacção mais extensa por parte de *L. plantarum* comparativamente com os restantes microrganismos, o que vem confirmar que, nos primeiros estágios actuam espécies de *Leuconostoc* e, posteriormente, espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Font de Valdez et al., 1990). *L. plantarum* é a espécie que apresenta maior resistência aos níveis de acidez, pelo que é esta que prevalece no final do processo fermentativo.

As curvas de crescimento de *L. mesenteroides* evidenciam um rápido decréscimo de viabilidade a partir das 30 horas, devido a uma fraca resistência a pH baixos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores, que indicam *L. mesenteroides* como espécie predominante na fase inicial do processo fermentativo (Gardner et al., 2001; Hubert e Dupuy, 1994).

A concentração mais elevada em ácido láctico foi observada com *Lactobacillus plantarum*, principalmente depois das 40 horas. Resultados semelhantes foram obtidos por Gardner et al. (2001) em fermentações com sumo de vegetais e culturas puras de LAB. Apesar disso, a percentagem em ácido láctico obtida no nosso trabalho foi sempre superior à observada naqueles estudos. A utilização de sumo de couve, em vez da mistura utilizada por aqueles autores, poderá eventualmente explicar essas diferenças.

Realizou-se também uma inoculação simultânea dos diferentes microrganismos; no entanto, pela impossibilidade de diferenciação das colónias das bactérias lácticas utilizadas, devido à sua morfologia muito semelhante, não nos foi possível a obtenção de resultados mais conclusivos em relação à predominância das espécies ao longo do processo fermentativo. No entanto, os dados obtidos permitem confirmar a informação já referida sobre a presença dos três microrganismos nas primeiras horas do processo e uma prevalência de *L. plantarum* na fase final das fermentações.

CONCLUSÕES

L. plantarum apresentou uma maior eficácia no processo fermentativo da salicórnia, tendo-se verificado maior produção de ácido láctico e conseqüente decréscimo de pH. Comparativamente com outras estirpes estudadas apresentou uma maior extensão da reacção, em parte devido à sua maior resistência a níveis mais elevados de acidez.

Futuramente, a verificação da existência destas bactérias na flora indígena será de extrema relevância, tal como a análise de toda a flora bacteriana da própria planta.

Outros estudos podem ser efectuados, quer adoptando outros modelos fermentativos, quer introduzindo melhorias no modelo aqui descrito, quer ainda procedendo a análises físico-químicas da composição do meio de cultura ao longo da fermentação, diferentes meios de fermentação, ou mesmo diferentes microrganismos. As condições de fermentação são

determinantes na qualidade do produto final, deste modo, também poderiam ser testadas diferentes temperaturas, diferentes substratos ou mesmo diferentes percentagens de NaCl no meio. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que, desde que utilizado um sumo adequado para a inoculação das bactérias lácticas apropriadas, a salicórnia pode ser fermentada com sucesso. A qualidade alimentar deverá, contudo, ser avaliada em futuros trabalhos. Também deverão ser observados outros parâmetros como a textura e a firmeza da planta fermentada.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Programa Ideia - Prime, ADI 13-02-04-FDR-01269 – Desenvolvimento de aplicações para a planta halófila *Salicornia*. Os autores agradecem à Necton, Belamandil, Portugal, o fornecimento de semestres de *Salicornia*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel Gadir, A.M.; Mohamed, M.; Abd-el-Malek, Y.; Ahmad, I.H.; Akinrele, I.A.; Arroyo, P.T.; Ludovico, L.A.; Chiu, Y.N.; Solidum, H.T.; Manalo, T.; Bigueras, C.N.; Lero, M.; Alcanatara, E.E.; Azmey, M.S.M.; Banigo, E.O.I.; Besrat, A.; Chang, C.-H.; Cullen, R.; Demerdash, M.; Economidou, P.; Ekmon, T.D.; Gatumbi, R.W.; Muriru, N.; Gifawesen, C.; Gobezie, A.; Hamdi, Y.A.; Hartles, P.; van Hoodonk, J.; LaRiviere, J.W.M.; Kandler, O.; Kwon, T.-W.; Mahmoud, S.A.Z.; Mashhoor, W.A.; El-Hosseiny, S.M.; Taha, S.M.; Ishac, Y.Z.; El-Nakhal, M.N.S.; Mbugua, S.K.; Merican, Z.; Mheen, T.-I.; Lee, K.-H.; Lee, S.-R.; Mital, B.K.; Mogilevsky, S.; Morcos, S.R.; Mukherjee, S.; Chaudhuri, D.R.; Gangopadhyay, H.; Nagodawithana, T.; Nyako, K.O.; Ogunsua, A.O.; Okafor, N.; Onyekwere, O.O.; Park, K.-I.; Pederson, C.; Purushothaman, D.; Dhanapal, N.; Rangaswami, G.; Ramakrishnan, C.V.; Sanchez, P.C.; Shuaib, A.C.A.; Steinkraus, K.H.; Stetter, K.O.; Svanberg, U.; Tongananta, Q.; Orillo, C.A.; Ulloa, M.; Herrera, T.; Taboada, J.; Vogel, S.M.; Wang, H.-H.; Wong, P.-W.; Jackson, H.; Wood, B.J.B. e Yanasugondha, D. 1983. Acid-fermented vegetables. *In Handbook of indigenous fermented foods, Section II - Indigenous fermented foods involving an acid fermentation – preserving and enhancing organoleptic and nutritional qualities of fresh foods*, pp. 99–131. K. H. Steinkraus (Ed.), New York: Marcel Dekker, Inc.
- Amoa-Awua, W.K.; Appoh, F.E. e Jakobsen, M. 1996. Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima. *Int. J. Food Microbiol.*, Aug; 31(1-3): 87-98.
- Assis, J.; Pereira, M.R. e Pires, F.R. 2004. Caracterização do sapal e da flora a ele associada. No sítio <http://www.mar-alto.com/>, divulgação científica/ relatórios e publicações científicas. Citado a 26 Jan 2007.
- Aukrust, T.W.; Blom, A.; Sandtorv, B.F. e Slinde, E. 1994. Interactions between starter cultures and raw material in lactic acid fermentation of sliced carrot. *Lebensm.-Wiss. U.-Techol.* **27**: 337-341.
- Bates, R. P. e Matthews, R. F. 1971. Lactic acid fermentation of Florida vegetables. *In Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, Vol. 84, Miami, FL (pp. 254–257).
- Davy, A.J.; Bishop, G.F. e Costa, C.S.B. 2001. *Salicornia L. (Salicornia pusilla J. Woods, S. ramosissima J. Woods, S. europaea L., S. obscura P.W. Ball e Tutin, S. nitens P.W. Ball e Tutin, S. fragilis P.W. Ball e Tutin and S. dolichostachya Moıs)*. *Journal of Ecology*, **89** 681-707.

- Fleming, H.P. McFeeters, R.F., Thompson, R.L. e Sanders, D.C. 1983. Storage stability of vegetables fermented with pH control. *Journal of Food Science*, **48**: 975–981.
- Fleming, H.P. McFeeters, R.F. e Daesche. 1985. The lactobacilli, pediococci and leuconostocs: vegetable products. In Gilliland, S.E. (Ed.), *Bacterial starter cultures for foods*. CRC Press, Boca raton, FL, pp. 97-118.
- Font de Valdez, G.; de Giori, G.S.; Garro, M.; Mozzi, F. e Oliver, G. 1990. Lactic acid bacteria from naturally fermented vegetables. *Microbiol.-Alim.-Nutr.* **8**: 175-179.
- Gardner, N.J.; savard, T.; Obermeier, P.; Caldwell, G. e Champagne, C.P. 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int. Journal of Food Microbiology*, **64**: 261-275.
- Hubert, J.C. e Dupuy, P. 1994. Conservation des fruits et des légumes. In de Roissart, H. e Luquet, F.M. (Eds). *Bacteries lactiques*, Vol 2. Loriga, Uriage, pp. 233-243.
- Niketic-Aleksic, G.; Bourne, M.C. e Stamer, J.R. 1973. Preservation of carrots by lactic acid fermentation. *Journal of Food Science*, **38**: 84–86.
- Pederson, C.S. e Albury, M.N. 1969. The sauerkraut fermentation. New York State Agricultural Experiment Station *Technical Bulletin 824*. New York State Agricultural Experiment Station, Geneva.
- Renard, C.M.G.C.; Champenois, Y. e Thibault, J.F. 1993. Characterization of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell-wall of glasswort *Salicornia ramosissima*. *Carbohydrate Polymers*, **22**: 239-245.
- Salicorne. No sitio http://plantes.sauvages.free.fr/pages_plantes/plant_salicorne.htm . Citado a 1 Feb 2007
- Stamer, J.R.; Dickson, M.H.; Bourke, J.B. e Stoyla, B.O. 1969. Fermentation patterns of poorly fermenting cabbage hybrids. *Applied Microbiology*, **18**(3): 323–32.
- Stamer, J.R.; Stoyla, B.O. e Dunkel, B.A. 1971. Growth rates and fermentation patterns of lactic acid bacteria associated with the sauerkraut fermentation. *Journal of Milk and Food Technology*, **34**(11): 521–525.
- Untereiner, S. 1989. Étude théorique de la fermentation du chou en choucroute. Diplome de fin d'études, ENSIA-Massy, France.

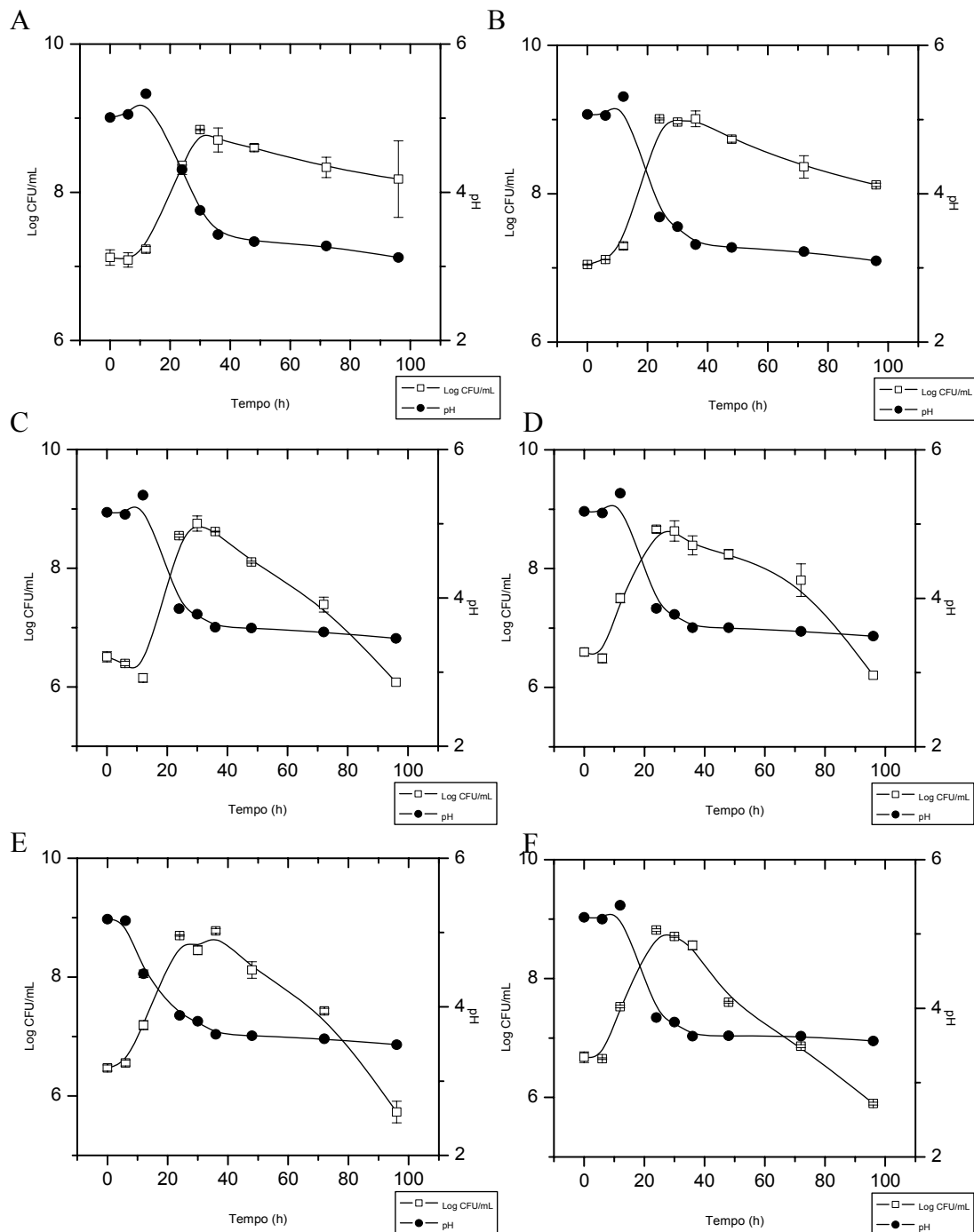


Figura 1: Variação do pH do meio inoculado com *L. plantarum* sem salicórnia (A) e com salicórnia (B), *L. mesenteroides* sem salicórnia (C) e com salicórnia (D), *P. acidilactici* sem salicórnia (E) e com salicórnia (F), função de log cfu/mL.

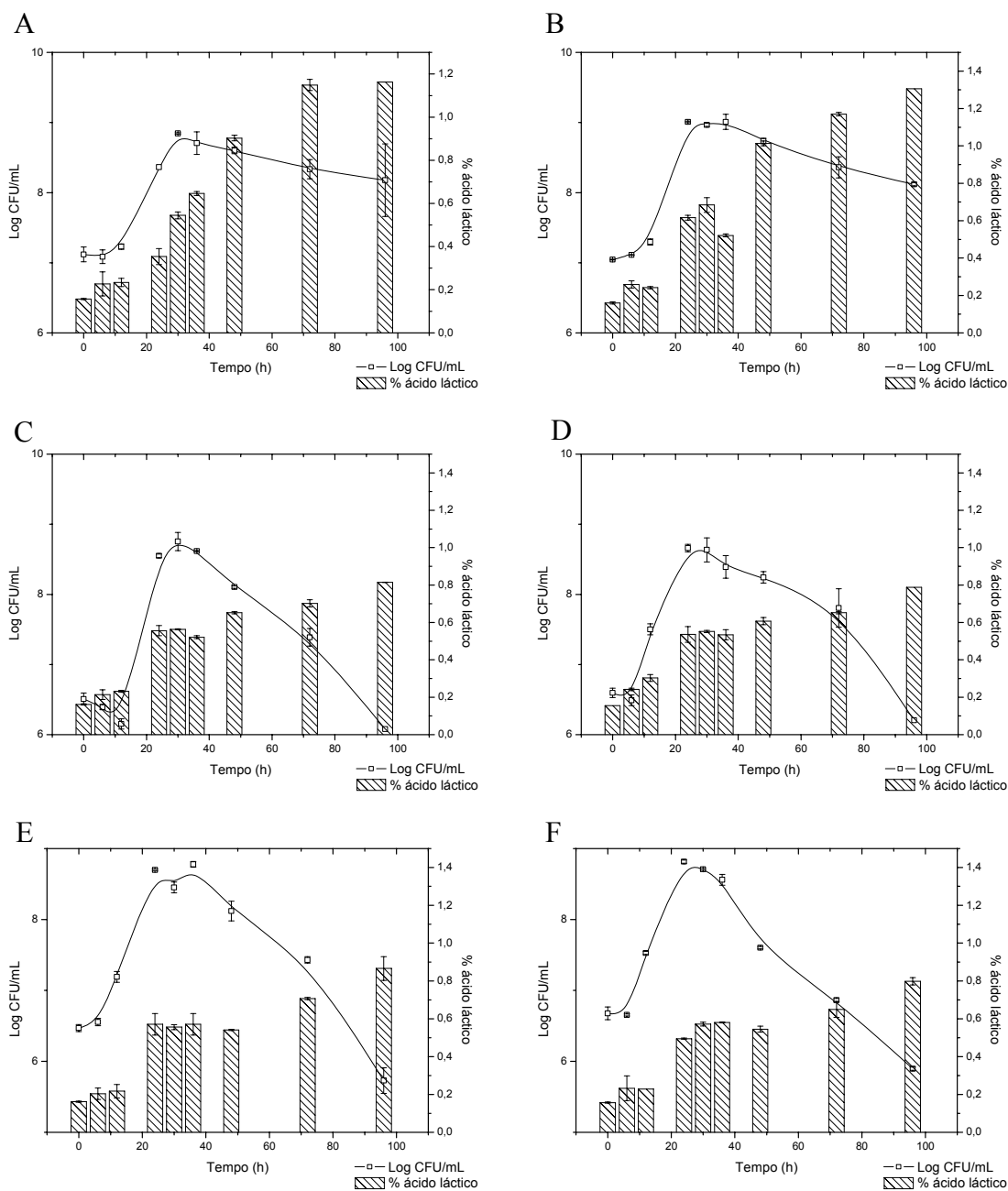


Figura 2: Variação da percentagem de ácido láctico ao longo do tempo por log cfu/mL em meio inoculado com *L. plantarum* sem salicornia (A) e com salicornia (B), *L. mesenteroides* sem salicornia (C) e com salicornia (D), *P. acidilactici* sem salicornia (E) e com salicornia (F).