

# **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA DO *Lactobacillus sakei* NA FERMENTAÇÃO DA SARDINHA-VERDADEIRA (*Sardinella brasiliensis*) UTILIZANDO GLICOSE COMO CARBOIDRATO FERMENTECÍVEL**

MILTON LUIZ PINHO ESPÍRITO SANTO \*

LUIZ HENRIQUE BEIRÃO \*\*

ERNANI SANT'ANNA \*\*

CESAR DAMIAN \*\*\*

BERNADETTE MELLO FRANCO \*\*\*\*

*Lactobacillus sakei* é comprovadamente uma cepa produtora de bacteriocinas e, neste estudo, procurou-se observar seus efeitos na fermentação de filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) em diferentes concentrações de NaCl e glicose. Verificou-se sua habilidade para produzir ácidos orgânicos e conseqüente redução do pH durante 21 dias de fermentação. Ao término desse período, a concentração de microrganismos deterioradores atingiu  $9,7 \log \text{UFC g}^{-1}$  correspondente a 6% de NaCl e 4% de glicose. Poucas diferenças foram observadas na produção de ácido lático quando se adicionou 2 e 4% de glicose, já que a acidez total foi 1,32 e 1,34%, respectivamente, para os experimentos com 6% de NaCl. O pH 6 inicial dos filés modificou-se ao término de 21 dias para 3,8, 3,9 e 4 nos experimentos com 2, 4 e 6% de NaCl. Tal comportamento pode ser atribuído ao poder inibidor do NaCl sobre a microbiota deterioradora. No término da fermentação, a concentração de bactérias ácido lácticas foi  $14,5 \log_{10} \text{UFC g}^{-1}$ . A relação entre o nitrogênio protéico e o nitrogênio solúvel total mostrou-se típica de pescado salgado/curado em perfeitas condições de consumo.

**PALAVRAS-CHAVE:** FILÉS DE SARDINHA-FERMENTAÇÃO; PESCADO SALGADO; *Lactobacillus sakei*.

\* Professor Adjunto, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS. (e-mail: mes@vetorial.net).

\*\* Professor Titular, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), SC. (e-mail: ernanis@cca.ufsc.br).

\*\*\* Professor Assistente, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFSC, SC. (e-mail: cdamian@cca.ufsc.br).

\*\*\*\* Professora Titular, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo, SP.

## 1 INTRODUÇÃO

Embora existam inúmeras técnicas mais eficientes para preservação do pescado, ainda se faz uso da salga e fermentação para obter produto diferenciado nos seus aspectos físico-sensoriais.

Um dos grandes inconvenientes nos produtos salgados e fermentados é o alto teor de NaCl que, invariavelmente, implica em dessalga (PIGOTT e TUCKER, 1990). As proteínas do pescado, quando comparadas com as de outros animais, apresentam conservação quase sempre acompanhada de difícil contenção das alterações deterioradoras (ROBINSON, 1991). Entretanto, quando essas transformações são controladas passam a ser benéficas produzindo *flavour* e odores apropriados, mascarando o sabor indesejável de algumas espécies e aumentando a aceitabilidade de outras (ROIG-SAGUÉS e EEROLA, 1997; LISTON, 1979). Na América do Sul, países como Peru, Chile e Argentina desenvolveram fermentações de anchovas (*Pomatomus saltator*), nas quais os peixes são misturados com NaCl na proporção de 30% e processados por fermentações que podem durar até 4 meses (LINDEN e LORIENT, 1994; BRASIL, 1998). Na Europa, os exemplos de produtos pesqueiros fermentados são encontrados na Escandinávia. Entre as espécies utilizadas encontram-se o arenque (*Clupea harengus*), o salmão (*Salmo salar*) e a truta (*Salmo trutta*), que produzem fermentados como o *gaffelbi* ou o *tidbits*, o *gravlax* e o *rakorett*, respectivamente. Inúmeros estudos têm demonstrado que a introdução de fermentação anaeróbica, associada à bactérias ácido lácticas é capaz de interromper temporariamente ou definitivamente os processos bioquímicos oxidativos e a deterioração microbiana (MAZO, 1999). Procurou-se avaliar, neste trabalho, a bacteriocinogenicidade do starter formado pelo *Lactobacillus sakei* 2a e o seu efeito na qualidade microbiológica da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), com ênfase na sua atividade contra as bactérias deterioradoras associadas ao processo fermentativo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) foram preparados a partir de 3 lotes de peixes inteiros e armazenados a -18 °C. Os experimentos foram realizados em níveis de 2, 4 e 6% de NaCl com adição de 2 e 4% de glicose. Os tratamentos foram desenvolvidos de forma independente, variando-se apenas um dos parâmetros operacionais (NaCl ou glicose). Em todos os tratamentos foram adicionados inóculos ( $8,0 \log_{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>)

de *Lactobacillus sakei* 2a. O processo desenvolveu-se na condição de salga úmida na proporção de 1:1, ou seja, 300 g de filés para 300 mL de salmoura.

Como cultivo iniciador utilizou-se a cepa *Lactobacillus sakei* 2a, isolada de lingüiça frescal (DE MARTINIS e FRANCO, 1998). Alíquotas de 1 mL da cultura foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em caldo MRS, formulado com 5% de glicose. Antes da utilização, as culturas foram reativadas em caldo MRS com incubação a  $30^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Caracterizou-se o *Lactobacillus sakei* 2a mediante estudo morfológico em meio sólido pela descrição visual da colônia isolada em ágar MRS. A observação microscópica baseou-se na forma, arranjo e coloração diferencial de Gram. A caracterização fisiológica foi determinada pelo crescimento em pH 3,9 e temperaturas diferenciadas (8, 15 e  $45^{\circ}\text{C}$ ), halofilismo em distintas concentrações salinas (6,5, 7 e 10% NaCl) e liquefação da gelatina com leitura até 7 dias (FAO, 1993; SILVA et al., 1997). Como teste complementar determinou-se o requerimento de oxigênio e a motilidade em meio semi-sólido (SILVA et al., 1997). A linhagem foi caracterizada bioquimicamente pelos seguintes ensaios: teste da catalase, produção de acetoina, prova do vermelho de metila, produção de  $\text{H}_2\text{S}$ , gás de glicose, descarboxilação da lisina, produção de indol e fermentação de carboidratos (sacarose, glicose, arabinose, galactose, maltose, lactose, ramnose, trealose, sorbitol, rafinose e xilose). As amostras foram incubadas a temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  e os resultados verificados até 7 dias (ICMSF, 1990). A produção de bacteriocinas foi detectada pela técnica da difusão em poços (*well - diffusion-assay*) (DE MARTINIS e FRANCO, 1998). A ativação e preparação do inóculo foram realizadas em caldo MRS. Após a incubação ( $30^{\circ}\text{C}$  por 18 horas) procedeu-se à ressuspensão de alíquota de 5 mL em 200 mL de caldo MRS com incubação a  $30^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. Posteriormente, porções de 10 mL da cultura ativada (carga celular de *Lactobacillus sakei* 2a equivalente a  $8,0 \log_{10} \text{UFC mL}^{-1}$ ) foram transferidas para as cubas de fermentação correspondentes aos tratamentos estabelecidos. A determinação da concentração celular do inóculo foi estimada por espectrofotometria a 520 nm, sendo as alíquotas para as leituras de absorbância centrifugadas a  $9,77 \times g$  por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 3 mL de água peptonada 1%, adicionada de 3 mL de solução de EDTA 1% e alcalinizada com NaOH 10M (DE MARTINIS e FRANCO, 1998).

Realizou-se a avaliação do número de células viáveis do inóculo em ágar MRS. As determinações microbiológicas correspondentes à contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, bactérias ácido lácticas,

coliformes fecais, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* e detecção de *Salmonella* sp. foram efetuadas segundo a APHA (1992).

A determinação da composição centesimal da matéria-prima foi realizada segundo técnicas da AOAC (1995), umidade e cinzas por gravimetria, proteínas pelo método micro-Kjeldahl e extrato etéreo (submersão) por extração com éter de petróleo.

Os caldos de fermentação tiveram seus conteúdos de nitrogênio solúvel total e protéico determinados pelo método Kjeldahl (FRAZIER e WESTHOFF, 1993).

O pH foi medido potenciométricamente (AOAC, 1995). Usando o mesmo homogeneizado preparado para a determinação do pH, a acidez titulável total foi determinada por titulação com NaOH 0,1N em presença de solução alcoólica de fenolftaleína 1%, com resultado expresso em ácido láctico (% p/p).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores da composição química (umidade, cinzas, lipídios e proteínas) dos filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) *in natura*. Com relação à percentagem de umidade, a variação situou-se na faixa correspondente aos peixes marinhos, entre 66 e 84% (AQUARONE et al., 1983). São citados na literatura teores entre 70-80% e 64-90% (BADOLATO et al., 1994). A estação do ano afeta o conteúdo de umidade do pescado, o que já foi constatado por outros autores quando relacionaram a época de captura com a composição centesimal (LEWUS et al., 1991). Na determinação da umidade de cinco espécies marinhas, incluindo a sardinha, BADOLATO et al. (1994) encontraram valores entre 77,2 e 83,8% para capturas no inverno de 1992. O resultado referente ao teor de lipídios (Tabela 1) também é coerente com a literatura (MULLER e TOBIN, 1991). Quanto aos lipídios, pesquisas mostraram que peixes de águas tropicais costumam apresentar teores muito inferiores aos do Hemisfério Norte (BERTULLO, 1975). Fato realmente constatado neste trabalho. A importância da variação sazonal é complexa, pois as sardinhas (*Sardinella* sp.) podem apresentar 2% de lipídios na primavera e até 8,6% no outono. As variações sazonais são atribuídas a espécies de plânctons predominantes em certas épocas do ano, havendo ainda a influência da idade do pescado. As sardinhas imaturas podem conter 3% de lipídios e aos 3 anos (fase de reprodução) entre 5 e 15% conforme a estação do ano.

**TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS FILÉS DA SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) IN NATURA**

	Composição centesimal (g/100 g)				
	A	B	C	X	Dp
Umidade	72,9	73,5	73,7	73,4	± 0,39
Lipídios	2,0	3,0	4,2	3,1	± 0,89
Proteínas	19,7	19,6	17,7	19,0	± 0,88
Cinzas	2,0	1,9	1,9	1,9	± 0,01

A, B, C = Lotes.

X = média; Dp = Desvio padrão.

A Tabela 2 mostra os resultados da avaliação microbiológica da sardinha (*Sardinella brasiliensis*) in natura, relacionada com microrganismos indicadores de higiene ou processamento, contaminação fecal, manipulação e patogênicos entéricos de veiculação hídrica.

**TABELA 2- AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) IN NATURA**

Microbiota	Enumeração		
	A	B	C
Microrganismos aeróbios mesófilos (UFC g <sup>-1</sup> )	3,5 x 10 <sup>2</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	4,4 x 10 <sup>3</sup>
Coliformes totais (NMP g <sup>-1</sup> )	< 3	< 3	< 3
Coliformes fecais (NMP g <sup>-1</sup> )	< 3	< 3	< 3
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC g <sup>-1</sup> )	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>
<i>Enterococcus</i> (UFC g <sup>-1</sup> )	3,5 x 10 <sup>2</sup>	3,5 x 10 <sup>2</sup>	3,5 x 10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g	Ausência em 25 g

A, B, C = Lotes.

Devido ao tipo de pesca, o tempo decorrido entre a captura da sardinha e a sua descarga nos portos é menor que para as outras variedades de peixes. Desse modo, pode-se esperar que apresentem cargas bacterianas mais reduzidas.

A contagem em placas (microbiota aeróbia viável), utilizada como indicador de higiene e/ou processamento, mostrou variações entre  $3,5 \times 10^2$  e  $1,1 \times 10^4$  UFCg<sup>-1</sup>. De acordo com o ICMSF (1990) os resultados indicam pescado com carga bacteriana normal das espécies marinhas tropicais. A Tabela 2 mostra resultados relacionados com o grupo dos coliformes totais e fecais, evidenciando práticas de higiene e sanidade adequadas, conforme padrões requeridos para o processamento desse alimento (MAZO, 1999). Utilizado como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanificação das superfícies operacionais (BRASIL, 1998), a enumeração de *Staphylococcus aureus* mostrou número de células reduzidas. Apesar da ausência de referencial relacionado com a presença de *Enterococcus* (microbiota típica de animais de sangue quente ou frio), esse índice fornece indicativo de qualidade higiênico-sanitária (SNEATH, 1986). Os resultados encontrados são desprezíveis, indicando matéria-prima de qualidade aceitável. Todos os lotes (A, B e C) apresentaram resultados negativos com relação à detecção de *Salmonella* sp.

Os fenômenos de aparecimento e resolução da rigidez cadavérica são rápidos em peixes, porém o enrijecimento *post mortem* e a queda do pH são graduais (geralmente, de pH 7 para 6 no caso do pescado magro e até 5,6 no músculo escuro do pescado gorduroso). É desejável que a conservação pelo frio ocorra o mais rápido possível em pH reduzido, possibilitando o aumento da vida de prateleira (LEWUS et al., 1991). Os resultados apresentados na Tabela 3 indicaram condições adequadas de conservação do pescado.

**TABELA 3 - VARIAÇÃO DO pH DA SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) IN NATURA**

	A	B	C	X	Dp
pH	6,1	5,9	6	6	± 0,08

A, B, C: Lotes.

X±Dp: Média ± Desvio padrão.

Os resultados morfotinturiais, decorrentes da observação microscópica dos isolados (*Lactobacillus sakei* 2a), foram obtidos utilizando-se metodologia por esgotamento em estrias em meio semi - sólido, com incubação a 30°C por 24 horas. A linhagem apresentou-se como cocobacilos Gram-positivos, com forma regular, isolados e em pares, com

ausência de esporos. A colônia isolada evidenciou coloração creme, com forma circular, superfície lisa, presença de brilho, com margem regular inteira, elevação convexa, consistência cremosa e tamanho entre 0,5 e 1 mm. A caracterização do cultivo é mostrada na Tabela 4, com incubação a 30°C e leitura de crescimento até 48 horas. Em teste complementar, a linhagem apresentou-se como aerotolerante sem motilidade em meio semi-sólido. Trata-se de espécie homofermentativa, que cresce a 8 e 15 °C, mas não se desenvolve a 45°C. Conforme BROCK (1974) sua característica indica espécie pertencente ao subgênero *Streptobacterium*.

**TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DO *Lactobacillus sakei* 2a**

pH	Halofilismo (% NaCl)			Crescimento (°C)			Liquefa <sup>a</sup> o da gelatina
	6,5	7,0	10	8	15	45	
3,9	+	+	w	+	+	-	-

(+) resultado positivo, (-) resultado negativo, (w) resultado positivo fraco.

A caracterização do *L. sakei* 2a segue o descrito por SNEATH (1986) para o gênero *Lactobacillus*, o qual raramente apresenta motilidade. Pode crescer em superfícies de meios semi-sólidos, por anaerobiose ou sob pressão reduzida de oxigênio entre 5-10% de CO<sub>2</sub> e não liquefaz a gelatina. É acidófilo, com crescimento em pH 5 ou menos e temperaturas entre 2 e 53°C.

GONZÁLEZ-FERNANDEZ et al. (1997), estudando a influência de cultivos iniciadores relacionados com as propriedades sensoriais de lingüiça tipo frescal, complementaram suas pesquisas caracterizando 2 cepas de *Lactobacillus sakei* e uma de *Pediococcus* sp. As linhagens isoladas de *L. sakei* também apresentaram crescimento em pH 3,9 e concentrações salinas entre 7 e 10% de NaCl. Tais autores estudaram a fermentação dessas cepas sobre carboidratos mediante ensaios semelhantes aos mostrados na Tabela 5. Duas cepas de *L. sakei*, pesquisadas, não apresentaram atividade fermentativa sobre arabinose, celobiose, maltose, ramnose e rafinose. Deve-se considerar que essas linhagens não produziram bacteriocinas.

A Figura 1 mostra a influência da concentração salina (2, 4 e 6% de NaCl) sobre o pH da sardinha submetida à cura na ausência da glicose e do

*starter*. Com 2 dias de fermentação, o pH manteve-se em 5,9 (2% de NaCl), 5,7 (4% de NaCl) e 5,5 (6% de NaCl). Com 4 dias, o pH atingiu 6,9 (2% de NaCl), 6,6 (4% de NaCl) e 6 (6% de NaCl). Já aos 5 dias de fermentação (6% de NaCl) o pH atingiu 6,6. Considerando a disponibilidade de nutrientes, conjugado com a elevada atividade de água e processamento em temperatura ambiente (23-24 °C), o poder tampão do substrato fez com que o pH se elevasse em direção à faixa alcalina, permitindo o metabolismo e a completa deterioração microbiana.

**TABELA 5- CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO *Lactobacillus sakei* 2a**

Produção	Reação ou crescimento	Fermentação	Reação ou crescimento
Catalase	-	Lactose	-
Acetona	+	Sacarose	+
GAS de glicose	-	Glicose	+
H <sub>2</sub> S	-	Ramnose	-
Índol	-	Xilose	-
Descarboxilação da lisina	+	Arabinose	+
Teste vermelho de metila	+	Rafinose	-
Bacteriocinas	+	Galactose	+
		Maltose	-
		Trealose	-
		Sorbitol	-

(+) = positivo      (-) = negativo.

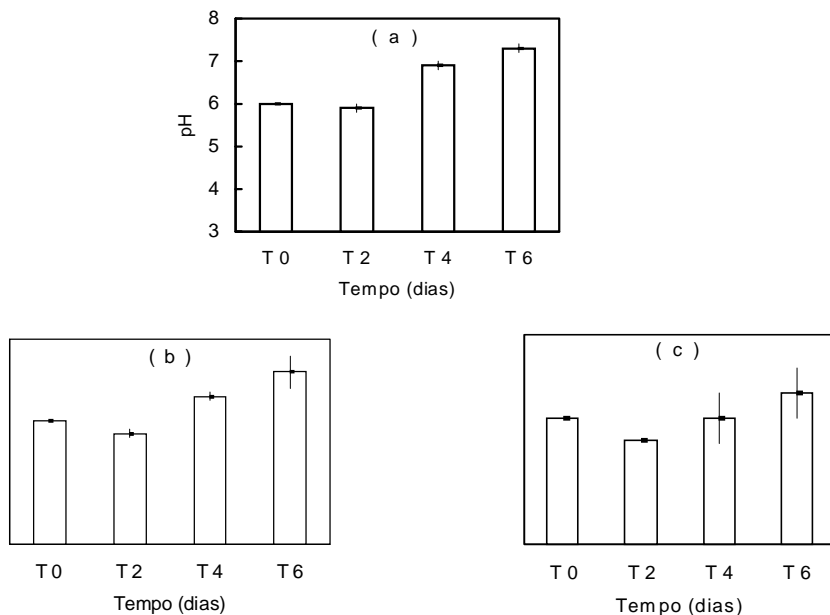
A adição da glicose ao processo foi necessária para promover adequada fermentação, pois o peixe apresenta reduzido teor de carboidratos livres. Os carboidratos encontram-se fundamentalmente no músculo e fígado, representados por pequenas quantidades de polissacarídeos glicogênicos. O conteúdo de glicogênio no tecido muscular varia entre 0,05 e 0,85% (FRAZIER e WESTHOFF, 1993), o que o torna sem efeito no processo fermentativo. O amido com diferentes graus de geleificação e degradação é usado na maioria dos produtos tradicionais, porém poucas bactérias ácido lácticas têm sido identificadas como produtoras de amilase. A eficiência da fermentação láctica foi monitorada pela relação entre o decréscimo do pH com a correspondente elevação da acidez e o balanço entre a enumeração das bactérias ácido lácticas (BAL) em MRS e deterioradoras em PCA.

O baixo crescimento das bactérias ácido lácticas (BAL) em PCA facilita a exclusão do total das bactérias deterioradoras, possibilitando as correspondentes enumerações traduzidas pela competição entre ambas.



O resultado das análises físico-químicas indicaram que houve decréscimo do pH durante o desenvolvimento da fermentação, com tendência à estabilização entre 3,8 e 4,2, após 21 dias (Tabela 6). Uma das causas do efeito do rebaixamento inicial do pH seria a produção de ácido a partir do *starter* inoculado, inibindo a multiplicação da carga microbiana de deterioração e permitindo a seqüência da fermentação. Com decréscimo do pH para valores inferiores a 4,4 (Tabela 6), no início da fermentação a microbiota láctica multiplica-se rapidamente, resultando em redução imediata ainda maior. Mecanismo inespecífico, a produção de ácido afeta todas as bactérias acidossensíveis indiscriminadamente. GORY et al. (2001) mencionam esse comportamento na avaliação do crescimento de três cepas de *L. sakei* (duas geneticamente modificadas), associado à produção de lactato e variação de pH. O valor inicial do pH (5,6) decresceu para 4,2 a 30 °C e 4,4 a 22 °C em 24 horas.

**FIGURA 1 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO SALINA SOBRE O pH DA SARDINHA SUBMETIDA AO PROCESSO DE CURA, NA AUSÊNCIA DA GLICOSE E *STARTER*. O EFEITO SOBRE O pH INICIAL DO SUBSTRATO FOI COMPARADO PELA ADIÇÃO DE 2% DE NaCl (A), 4% DE NaCl (B) E 6% DE NaCl (C) (P/P)**



**TABELA 6 - EFEITO DA GLICOSE E NaCl SOBRE O VALOR DO pH NA FERMENTAÇÃO DA SARDINHA PELO *Lactobacillus sakei* 2a**

Tempo (dias)	2% glicose			4% glicose		
	2%	NaCl 4%	6%	2%	NaCl 4%	6%
0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
7	4,1	4,2	4,3	4,0	4,1	4,2
14	4,1	4,2	4,3	4,0	4,0	4,1
21	4,0	4,1	4,2	3,8	3,9	4,0

A Tabela 7 mostra a produção de ácido láctico, reproduzindo os tratamentos com aplicação do *starter* associado a 2 e 4% de glicose e a 2, 4 e 6% de NaCl. Pode-se observar que com a adição de 2% de glicose e 2% de NaCl, a acidez após 21 dias apresentou o valor máximo (2,55%). Com 4% de glicose e equivalente teor salino atingiu 2,64%. Quando se agrega 2% de glicose e 2% de NaCl o pH da sardinha decresce para 4,1 em 7 dias e para 4 em 21 dias. Reciprocamente, a acidez aumenta para 1,21 e 2,55%, respectivamente. Com 4% de glicose e 2% de NaCl, o pH da sardinha decresce para 4 em 7 dias e para 3,8 em 21 dias. Por sua vez, a acidez aumenta para 1,77% (7 dias) e 2,76% (21 dias). Contrariamente, na ausência da glicose e, considerando as 3 concentrações salinas (2, 4, e 6% de NaCl), a acidez mostrou tendência à queda, comprovada pela deterioração do pescado com 6 dias de processamento. Trabalhos similares mostram que os comportamentos do pH e da acidez não diferem. ADAMS et al. (1987), estudando a avaliação do ácido láctico na preservação de truta (*Salmo trutta*), monitoraram a eficiência da fermentação com tratamentos envolvendo *starters* comerciais compostos por cepas de *L. plantarum* e *P. pentosaceus*. Tais autores evidenciaram relação de rebaixamento do pH com a adição de 5% de sacarose. O aumento na concentração de NaCl (6%) também reduziu a relação de fermentação. Utilizando 1% de NaCl, 4% glicose e *L. plantarum* houve redução de pH para 5,4 nas primeiras 24 horas e para 4,2 após 4 dias. Com 2 e 3% de NaCl houve baixa fermentação durante os 3 primeiros dias, o pH manteve-se entre 6 e 6,5 após 24 horas e atingiu 4,2 com 4 dias de fermentação. Com 4 a 6% de NaCl, o pH manteve-se em torno de 6,5, com incubação de 7 dias. A repetição com diferentes tratamentos mostrou diferenças no período mais importante, os 2 primeiros dias de

fermentação. Tal fato pode refletir as diferenças entre os graus de frescor do peixe, afetando a relação entre as bactérias ácido lácticas e a microbiota competidora.

Os resultados apresentados na Tabela 8 indicaram rápida fermentação láctica do substrato (peixe). A contagem em MRS, a partir do sétimo dia de fermentação e até o vigésimo primeiro, excedeu a dos deterioradores entre  $1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$  e  $5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ . A relação de fermentação foi maior em todos os tratamentos quando se considera a utilização de 4% de glicose, proporcionando diferença na contagem em MRS de pelo menos  $1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ . Muitos carboidratos, incluindo os amiláceos, são bons substratos para as BAL e o uso desse tipo de nutriente pode provocar grande atividade láctica. Os principais carboidratos que podem ser utilizados nestas fermentações incluem o arroz cozido e o pré-fermentado ou farináceos de mandioca (TWDDY et al., 1987).

**TABELA 7 - EFEITO DA GLICOSE E NaCl SOBRE O VALOR DA ACIDEZ, DURANTE A FERMENTAÇÃO DA SARDINHA PELO *Lactobacillus sakei* 2a**

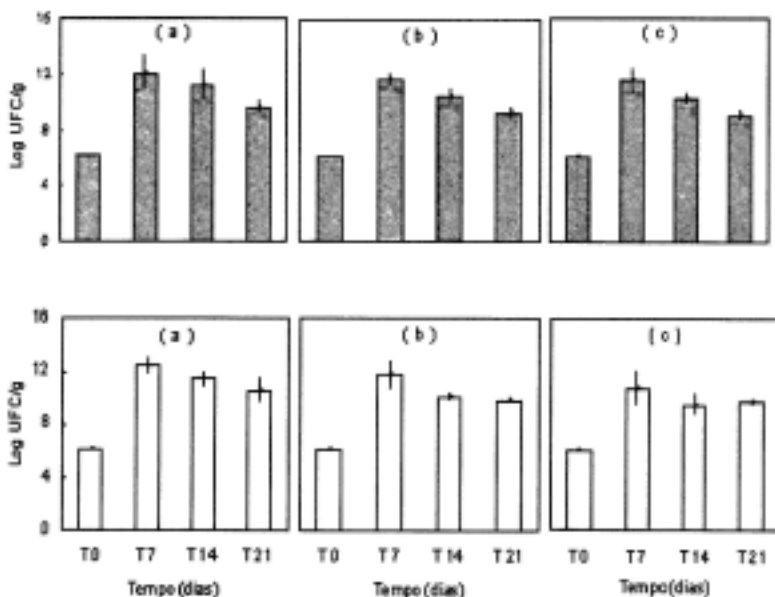
Tempo (dias)	2% glicose			4% glicose		
	2%	NaCl		2%	NaCl	
		4%	6%		4%	6%
0	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
7	1,21	1,12	0,74	1,77	1,42	0,79
14	1,73	1,60	1,22	2,55	2,23	1,32
21	2,55	2,23	1,32	2,76	2,64	1,34

**TABELA 8 - EFEITO DA GLICOSE E NaCl NO CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS EM MRS ( $\text{LOG}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ ) DURANTE A FERMENTAÇÃO DA SARDINHA PELO *Lactobacillus sakei* 2a**

Tempo (dias)	2% glicose			4% glicose		
	2%	NaCl		2%	NaCl	
		4%	6%		4%	6%
0	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2
7	11,6	9,9	8,9	11,6	11,0	9,8
14	13,6	13,2	11,9	14,6	13,6	12,9
21	14,2	14,0	12,9	15,3	15,0	14,5

ADAMS et al. (1987) estudaram a fermentação espontânea de peixes com adição de glicose e NaCl. Avaliaram diversos fatores que favorecem a rápida fermentação láctica como o decréscimo do pH para valores inferiores a 4,5 nas primeiras 48 horas e a eficiência da multiplicação das BAL com decréscimo dos microrganismos deterioradores. Os estudos com *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* mostraram que a relação de fermentação aumenta conforme o teor de glicose ou sacarose utilizado (entre 1 e 5%). Entretanto, o aumento na concentração salina provoca redução no crescimento desses microrganismos com conseqüente diminuição na velocidade de fermentação. Tais autores afirmaram que cada fermentação depende da microbiota acompanhante, da composição do alimento, da atividade de água, do pH, da concentração de NaCl e da temperatura de processo.

**FIGURA 2 - VARIÇÕES NA CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS SOBRE PCA (LOG<sub>10</sub> UFC g<sup>-1</sup>) DURANTE A FERMENTAÇÃO DA SARDINHA PELO *Lactobacillus sakei* 2a, COM 2% E 4% DE GLICOSE. O EFEITO FOI COMPARADO PELA ADIÇÃO DE 2, 4 e 6% DE NaCl**

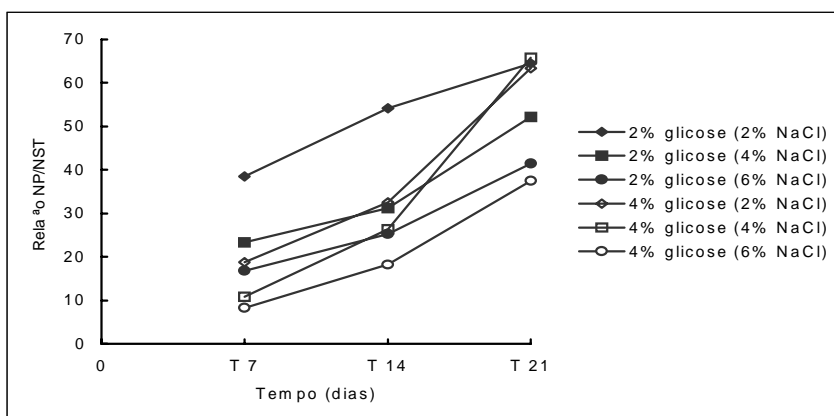


■ - 2% de glicose, □ - 4% de glicose.

(a) = 2% NaCl, (b) = 4% NaCl, (c) = 6% NaCl.

O conteúdo de nitrogênio protéico do sobrenadante de todas as amostras aumentou com o tempo de fermentação. Amostras contendo 2% de NaCl mostraram valores maiores do que aquelas contendo 6%, independente do teor de glicose utilizado. O aumento do conteúdo de nitrogênio protéico pode ser atribuído ao efeito combinado da autólise e degradação microbiana do músculo do peixe. A evidência para a autólise neste experimento pode ser demonstrada pela variação na relação do nitrogênio protéico (NP) para o nitrogênio solúvel total (NST) (Figura 3). Tal relação aumentou durante o período de fermentação.

**FIGURA 3 - EVIDÊNCIA DA AUTÓLISE DURANTE A FERMENTAÇÃO DA SARDINHA (*Sardinella brasiliensis*) PELO *Lactobacillus sakei*2a**



A utilização de *Lactobacillus* e *Streptococcus* na fermentação de resíduos de pescado, como alternativa para produção de alimentação animal foi pesquisada por ARECHE e BERENZ (1989). Demonstraram a eficácia das bactérias associada com as mudanças nas características físico-químicas e microbiológicas do pescado. Nas primeiras 24 horas de fermentação, os inóculos adicionados em diferentes concentrações (2,5 e 10%) ocasionaram ligeiro aumento das bases voláteis nitrogenadas e em especial da histamina. Posteriormente, as concentrações destes compostos foram diminuindo lentamente, contribuindo para a redução do nitrogênio solúvel total, com decréscimo significativo e constante durante as 300 horas de processamento. De modo semelhante, os resultados relacionados com o nitrogênio solúvel total (NST) obtidos com a fermentação da sardinha evidenciaram controle natural da fermentação.

A atividade do *starter* sugere reação amino-negativa, prevenindo a formação de aminas durante o processo de fermentação. É possível que também reduza a atividade de bactérias descarboxilases na formação de aminas biogênicas, contribuindo para a redução do nitrogênio solúvel total. Os riscos microbiológicos na fermentação da sardinha (*Sardinella brasiliensis*) estão sempre associados à formação de histamina (ROIG-SAGUÉS e EEROLA, 1997; SILVA et al., 1998).

ROIG-SAGUÉS e EEROLA (1997) adotaram critérios de seleção para a utilização de bactérias ácido lácticas em alimentos. Mencionaram que a ocorrência de aminas biogênicas é previsível nos produtos, principalmente nos fermentados espontaneamente por microbiota indefinida, e que a seleção de *starter* apropriado reduzirá a formação de aminas biogênicas. Esses autores também estudaram a formação de bases aminadas em carne picada inoculada com *Lactobacillus sakei*. Demonstraram que o efeito do *starter* depende da presença de microrganismos descarboxilases na matéria-prima e que os efeitos são diferentes para cada amina produzida.

#### 4 CONCLUSÃO

O estudo indicou que *Lactobacillus sakei* 2a constitui cepa apropriada para a fermentação da Sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*). As condições de processamento foram mais favoráveis para esse lactobacilo, com conseqüente inibição do crescimento das bactérias deterioradoras.

Bactérias ácido lácticas com características bacteriocinogênicas e competitivas podem promover barreira adicional para aumentar a preservação do pescado por meios naturais. A implementação da biopreservação em determinados sistemas alimentares sempre dependerá da formulação, da tecnologia utilizada, da viabilidade da cultura na produção de bacteriocinas como também da adaptação das culturas aos meios (alimentares) específicos.

#### Abstract

##### **EVALUATION OF BACTERIOCIINOGENIC ACTIVITY OF *Lactobacillus sakei* IN THE FERMENTATION OF TRUE SARDINE (*Sardinella brasiliensis*) BY UTILIZING GLUCOSE AS FERMENTABLE CARBOHYDRATE**

*Lactobacillus sakei* 2a is a bacteriocin producer strain and, in this study, its effects as a starter culture in the curing process of sardine (*Sardinella brasiliensis*) filets were observed at different concentrations of sodium chloride and glucose. Its ability to produce organic acids and pH reduction during 21 days of fermentation was verified. After this

period, the deteriorative microbiota concentration reached  $9.7 \log_{10}$  CFU.  $g^{-1}$  corresponding to 6% sodium chloride and 4% glucose. Little differences were observed in lactic acid production when 2 and 4% glucose were added, since total acidity was 1.32 and 1.34% respectively for the experiments with 6% NaCl. Initial pH of fillets was 6 and after 21 days pH values were 3.8, 3.9 and 4 for the experiments with 2, 4 and 6% NaCl. This may have been due to the inhibitory properties of NaCl over the deteriorative microbiota. At the end of the fermentation process lactic acid bacteria concentrations were  $14.5 \log_{10}$  CFU. $g^{-1}$ . The ratio protein nitrogen and total soluble nitrogen was typical of a cured fish under perfect eating conditions.

**KEY-WORDS:** SARDINE FILLETS-FERMENTATION; CURED FISH; *Lactobacillus sakei*.

## REFERÊNCIAS

- 1 ADAMS, M.R.; COOKE, R.D.; TWIDDY, D.R. Fermentation parameters involved in the production of lactic acid preserved fish-glucose substrates. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.22, n.2, p.105-114, 1987.
- 2 AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis AOAC international**. 16<sup>th</sup> ed. Washington, 1995. 1141 p.
- 3 APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3<sup>rd</sup> ed. Washington, 1992. 1219 p.
- 4 AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: E. Blücher, 1983. 227 p.
- 5 ARECHE, T. N.; BERENZ, Z. Ensilado de residuos de pescado por bacterias del yogur. **Boletín de Investigación - Instituto Tecnológico Pesquero del Peru**, Callao, v.3, p. 26-36, 1989.
- 6 BADOLATO, E.S.G.; CARVALHO, J.B.; AMARAL MELLO, M.R.P.; TAVARES, M.; CAMPOS, N.C.; AUED-PIMENTEL, S.; MORAIS, C. Composição centesimal de ácidos graxos e valor calórico de cinco espécies de peixes marinhos nas diferentes estações do ano. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.54, n1, p.27-35, 1994.
- 7 BERTULLO, V.H. **Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1975. 538 p.
- 8 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 451 de 1997. Princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2 de julho de 1998. p. 6.
- 9 BROCK, T.D. **Biology of microorganisms**. 5<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1974. p. 697-704.
- 10 DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of foodborne by bacteriocin-producing *Leuconostoc* sp and *Lactobacillus sakei* isolated from "lingüiça fresca". **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, n.4, p.284-287, 1998.
- 11 FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Manual de técnicas para laboratório de nutrición de peces y crustáceos. Programa cooperativo governamental**. Mexico, 1993. 104 p.

- 12 FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 681 p.
- 13 GONZÁLES-FERNANDEZ, C.; SANTOS, E.M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Utilización de cultivos iniciadores en la elaboración de chorizo y su influencia en las propiedades sensoriales. **Food Science and Technology International**, New York, v.3, n.1, p.31-42, 1997.
- 14 GORY, L.; MONTEL, M.C.; ZAGOREC, M. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Letters**, Amsterdam, v.194, n.2, p.127-133, 2001.
- 15 ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications For Foods. **Microorganisms in foods: their significance and methods for enumeration**. 3<sup>rd</sup> ed. Toronto, 1990.
- 16 LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.1683-1688, 1991.
- 17 LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola**. Zaragoza: Acribia, 1994. 428 p.
- 18 LISTON, J. Microbiology in fishery science. In: CONNELL, J.J. **Advances in fish science and technology**. Aberdenn: Fishing News Books, 1979. p.138-157.
- 19 MAZO, J.Z. **Deteção de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN em melão de cana-de-açúcar sob fermentação submersa**. Florianópolis, 1999. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 20 MULLER, H.G.; TOBIN, G. **Nutrición y ciencia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1991. 321 p.
- 21 PIGOTT, G.M.; TUCKER, B.W. **Seafood: effects of technology on nutrition**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 32-65.
- 22 ROBINSON, D.S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1991. 516 p.
- 23 ROIG-SAGUÉS, A.; EEROLA, S. Biogenic amines in meat inoculated with *Lactobacillus sakei* starter strains and an amine-positive lactic acid bacterium. **Food Research and Technology**, New York, v. 205, n.3, p.227-231, 1997.
- 24 SILVA, C.C.G.; DA PONTE, J.B.; DAPKEVICIUS, M.L.N.E. Storage temperature effect on histamine formation in big eye tuna and skipjack. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, n.4, p.644-647, 1998.
- 25 SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295 p.
- 26 SNEATH, P.H.A. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: BERGEY'S manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams e Wilkins, 1986. v. 2.
- 27 TWDDY, D.R.; CROSS, S.J.; COOKE, R.D. Parameters involved in the production of lactic acid preserved fish-starchy substrate combinations. **International Journal of Food and Technology**, Mysore, v.22, p.115-121, 1987.