

# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO *LACTOBACILLUS SAKEI* NA FERMENTAÇÃO DO BONITO-DE-BARRIGA-LISTRADA (*EUTHYNNUS PELAMIS*)

JARBAS SOUZA\*; LUIZ GUSTAVO GONÇALVES RODRIGUES\*; PABLO NERY MACHADO GONZALEZ\*; RAMON TORTATO\*; NÁDIA CARBONEA\*\*; MILTON LUIZ PINHO ESPÍRITO SANTO\*\*\*

\*Graduandos em Engenharia de Alimentos – FURG; \*\* Mestranda em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG;

\*\*\*Professor do Dep. de Química - FURG

## RESUMO

As bactérias lácticas, das quais faz parte o *Lactobacillus sakei*, são um grupo heterogêneo de microrganismos com espectro antibacteriano, modo de ação e propriedades químicas específicos. São conhecidas como produtoras de diferentes metabólitos antibacterianos, incluindo ácidos orgânicos, bacteriocinas, diacetil, peróxido de hidrogênio e reuterina. Este estudo trata da fermentação do bonito-de-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*), utilizando como cultivo iniciador o *L. sakei* e glicose como carboidrato fermentescível. Os valores de pH e acidez do meio variaram entre os experimentos com a adição de 2, 4 e 6% de glicose, do que se pode concluir que o aumento na concentração do carboidrato fermentescível ocasiona maior diminuição do pH e aumento da acidez, cujos valores encontrados foram: 4,25 e 2,84%, 4,18 e 3,78%, 4,11 e 3,95%, respectivamente. O pescado utilizado se encontrava em boas condições para o processamento, evidenciadas pela avaliação microbiológica. As amostras apresentaram enumerações de microrganismos aeróbios viáveis dentro dos limites aceitáveis. Os resultados das avaliações de coliformes fecais foram inferiores a  $10^3$  NMP g<sup>-1</sup>, evidenciando práticas de higiene e sanificação adequadas. A determinação de *Staphylococcus* coagulase positiva mostra que não houve detecção desse microrganismo. Todas as amostras apresentaram resultados negativos com relação à detecção de *Salmonella* sp. Os resultados do pH indicam um pescado em condições adequadas de conservação. O conteúdo de nitrogênio total dos sobrenadantes de todas as amostras aumentou com o tempo de fermentação. Amostras contendo 4 e 6% de glicose mostraram valores maiores que aquelas contendo 2% glicose.

**PALAVRAS-CHAVE:** Pescado fermentado, bactérias lácticas, *Lactobacillus sakei*, bonito-de-barriga-listrada, *Euthynnus pelamis*.

## ABSTRACT

*Lactobacillus sakei* belongs to lactic acid bacteria, a heterogeneous group of microorganisms with specific antibacterial spectrum, mode of action and chemical properties. They are known as producing different antibacterial metabolites, including organic acid, bacteriocin, diacetil, hydrogen peroxide and reuterin. This is a study about fermentation of *Euthynnus pelamis* tuna using *L. sakei* as starter and glucose as carbohydrate. The values of pH and acidity of the medium ranged among the experiments with 2, 4 and 6% of glucose, so the conclusion is that the increase of carbohydrate concentration causes a bigger reduction of pH and increase of acidity: 4.25 and 2.84%, 4.18 and 3.78%, 4.11 and 3.95%, respectively. Fish was in good condition for food processing, according to microbiological assessment. Samples had mesophilic aerobic microorganisms within the acceptable values. The outcome of sample analyses of fecal coliform was below  $10^3$  NMP g<sup>-1</sup>, evidencing adequate hygiene and sanification according required standards. The assessment of positive *Staphylococcus* coagulase shows no presence of this microorganism. All samples were negative for *Salmonella* sp. The results of pH of the samples indicate adequately preserved fish. Total nitrogen content of all samples increased with fermentation time. Samples with 4 and 6% of glucose had higher values than those with 2% glucose.

**WORD-KEY:** Fermented fish, lactic acid bacteria, *Lactobacillus sakei*, *Euthynnus pelamis* tuna.

## 1 – INTRODUÇÃO

O crescimento de microrganismos indesejáveis nos alimentos para consumo humano contribui para a redução da vida-de-prateleira desses produtos e conseqüentemente traz perda econômica. Cresce o reconhecimento da importância da conservação dos alimentos, como resultado da urbanização, do aumento da população, do maior conhecimento dos microrganismos patogênicos de origem alimentar, da habilidade para se multiplicarem a baixas temperaturas e do aumento do número de pessoas imunodeficientes ou imunocomprometidas, que são as mais suscetíveis às doenças de origem alimentar. Além disso, atualmente há uma demanda de alimentos mais saudáveis ou “naturais”, com longa vida-de-prateleira, preferência por alimentos minimamente processados, palatáveis, de fácil consumo, disponíveis durante o ano inteiro, nutritivos e de baixo custo. Os consumidores também estão preferindo alimentos que contenham o mínimo de aditivos químicos. Assim, com a aprovação e o uso de aditivos químicos, os consumidores estão cientes de que tais substâncias são potencialmente danosas à saúde humana, comprometem a qualidade nutricional ou deixam características indesejáveis nos alimentos. As indústrias de alimentos preferem que seus produtos contenham apenas os ingredientes que os consumidores consideram “naturais”.

Diversas técnicas têm sido estudadas para o controle de microrganismos patogênicos presentes nos alimentos. Doenças de origem alimentar, ocasionadas por microrganismos, tornaram-se um grande e crescente problema de saúde pública mundial (BROMBERG, 2005). Portanto, é grande o interesse na biopreservação por meio de bactérias lácticas. Vários estudos nas últimas décadas têm sido direcionados ao isolamento destes microrganismos que podem ser usados para o controle de patogênicos como a *Listeria monocytogenes* em produtos alimentares (JEPPESEN; HUSS, 1993).

As bactérias lácticas, originalmente isoladas da carne e produtos de carne são provavelmente as que têm as melhores possibilidades para melhorar a segurança microbiológica desses alimentos, pois já estão praticamente adaptadas às condições do meio (protéico) e por isso são mais competitivas que as bactérias

láticas de outras origens (JEPPESEN; HUSS, 1993).

Também se reconhece que bactérias láticas são capazes de produzir outras substâncias inibidoras além de ácidos orgânicos, antagonistas a outros microrganismos. Essas substâncias são produzidas em pequena quantidade e incluem peróxido de hidrogênio, diacetil, bacteriocinas e produtos de reações secundárias como hipotiocianatos – obtidos geralmente pela ação da lacto-peroxidase sobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e os tiocianatos. As bactérias láticas são amplamente utilizadas na produção de queijos e leites fermentados, inclusive o iogurte, produzindo efeitos bioquímicos e biológicos sobre estes alimentos, resultando em produtos com definições sensoriais, nutricionais e probióticas de elevada importância funcional (DAESCHEL, 1989).

Os microrganismos presentes nos produtos fermentados de pescado são provenientes de quatro fontes: naturais do próprio pescado, da água do mar, do solo e de contaminantes oriundos das manipulações e equipamentos usados para a pesca e processamento. A microbiota presente nos alimentos fermentados marinhos é composta de grande variedade de lactobacilos, presentes nos peixes, camarões, lulas, ostras inteiras, vísceras ou ovas. Na década passada iniciaram-se vários estudos através de uma colaboração entre países, sobre a produção de peixe fermentado no sudeste da Ásia. Esses produtos podem ser divididos em duas categorias: a primeira, com alto teor salino (20-30%), em que a carga microbiana decresce durante a cura e, a segunda, com baixo teor de cloreto de sódio, em que carboidratos fermentescíveis são adicionados (OSTERGAARD et al., 1998).

O presente trabalho teve como objetivo geral a avaliação da bacteriocinogenicidade do cultivo iniciador formado pelo *Lactobacillus sakei* e o seu efeito na qualidade microbiológica do bonito-de-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*) fermentado. Foram analisadas as características físico-químicas envolvidas na produção de ácido lático com conseqüente redução do pH, a avaliação das mudanças microbiológicas associadas com o crescimento das bactérias láticas, a redução dos microrganismos deterioradores e a determinação do catabolismo de aminoácidos pela formação de aminas biogênicas associadas com a atividade aminopeptidase.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Material

#### 2.1.1 – Matéria-prima

Foi utilizada uma amostra com 3kg do tunídeo *Euthynnus pelamis*. O pescado foi mantido congelado a -18 °C, em condições adequadas de conservação até o momento de ser processado. Na amostragem, não foi levado em consideração o sexo da espécie, fatores fisiológicos e diferenças anatômicas. Houve o cuidado somente na escolha de peixes adultos.

#### 2.1.2 – Cultivo iniciador bacteriocinogênico

O *starter* utilizado foi a cepa *Lactobacillus sakei*. Aliquotas de 1mL da cultura foram mantidas a 4 °C em caldo para *Lactobacillus* DE MAN, ROGOSA e SHARPE – MRS, formulado com 5% de glicose. Antes, as culturas foram reativadas no mesmo meio (MRS), com incubação a 30 °C por 18 horas.

### 2.2 – Métodos

#### 2.2.1 – Fermentação do bonito-de-barriga-listrada

A matéria-prima, conservada sob congelamento a -18 °C, foi descongelada parcialmente, sob refrigeração a 4 °C, pesada, acondicionada em monoblocos de polipropileno e encaminhada à mesa de manipulação, onde foi eviscerada e cortada em postas (com pele) por processamento manual. Posteriormente, foi lavada com água potável corrente e drenada durante três minutos. A seguir, foi pesada e dividida em porções com 300g. O experimento foi conduzido conforme os parâmetros de fermentação, correspondente às seguintes concentrações: 2, 4 e 6% glicose, 2% NaCl. Os tratamentos foram desenvolvidos de forma independente, variando apenas um dos parâmetros experimentais (concentração de glicose). Os filés foram fermentados a temperatura ambiente (± 23 °C) durante 21 dias. A Figura 1 mostra o fluxograma correspondente ao processamento da fermentação.

A adição de glicose foi necessária para promover adequada fermentação, pois o peixe apresenta reduzido teor de carboidrato livre. A rapidez e a eficiência da fermentação foi monitorada a cada quatro dias, por meio da avaliação do pH com a correspondente formação da acidez e o balanço entre a enumeração das bactérias láticas em meio MRS e de microrganismos deterioradores em ágar de contagem (PCA) pelo método *pour plate*. O baixo crescimento das bactérias láticas em PCA facilita a exclusão do total de bactérias consideradas deterioradoras.

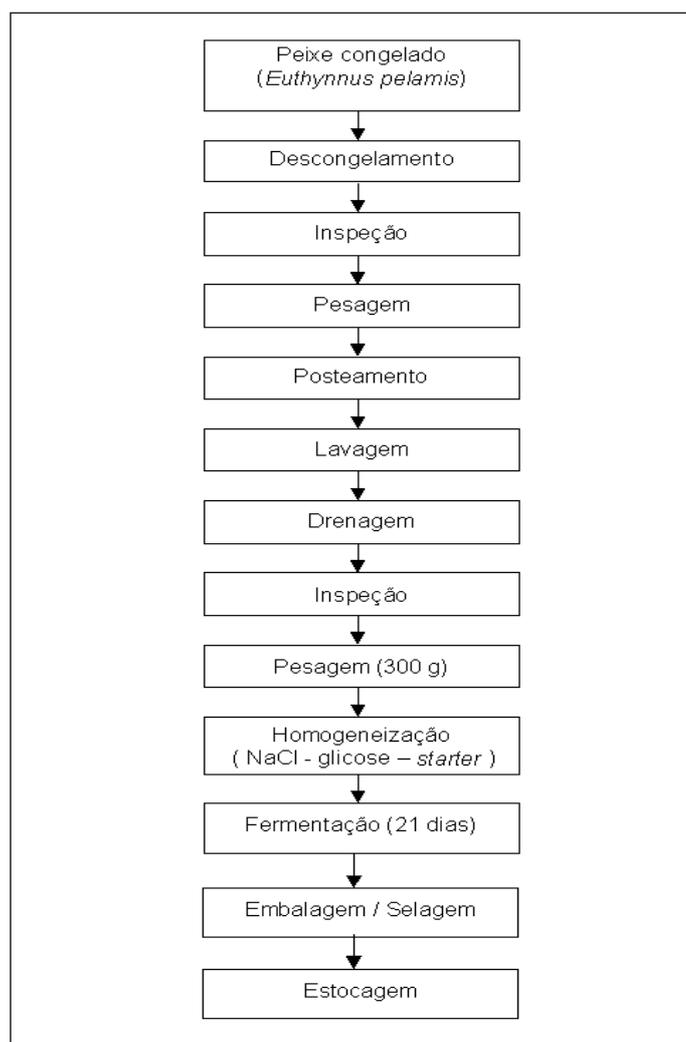


FIGURA 1 – Fluxograma operacional referente à fermentação do bonito-de-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*).

## 2.2.2 – *Lactobacillus sakei*

### 2.2.2.1 – Caracterização fisiológica

A caracterização fisiológica foi determinada por meio do crescimento em pH 3,9 a temperaturas diferenciadas (8, 15 e 45 °C) em caldo MRS (tempo máximo de incubação: sete dias), halofilismo em distintas concentrações salinas (5, 6, 7 e 10% NaCl) em caldo MRS, com leitura em até sete dias (SNEATH, 1986; MARTINIS; FRANCO, 1997). Como testes complementares, foram determinados o requerimento de oxigênio e a motilidade em meio semi-sólido (SNEATH, 1986).

### 2.2.2.2 – Ativação e preparação do inóculo

O inóculo foi obtido a partir da cepa ativada em caldo MRS (incubação a 30 °C durante 18 horas). Após a incubação, foi executada a ressuspensão de uma alíquota de 5mL em 200mL de caldo MRS e incubação a 30 °C por 12 horas. Posteriormente, porções de 10 mL da cultura ativada contendo uma carga celular de *L. sakei* equivalente a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> foram transferidas para as cubas de fermentação, correspondentes aos tratamentos preestabelecidos (KANASAKI et al., 1975).

### 2.2.2.3 – Espectrofotometria da biomassa

A densidade ótica foi estimada por leitura espectrofotométrica a 600 nm. As alíquotas (1mL) para as leituras de absorbância foram centrifugadas a  $9,77 \times g$  por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (células viáveis de *Lactobacillus sakei*) ressuspenso em 3 mL de solução de água peptonada 1% adicionada de 3 mL de solução de EDTA 1%, alcalinizada com NaOH 10 M, conforme metodologia desenvolvida por Mazo (1999).

#### 2.2.2.4 – Avaliação do número de células viáveis no inóculo

A enumeração das células viáveis de *Lactobacillus sakei* foi realizada em ágar MRS através de alíquotas (1mL) das correspondentes diluições por plaqueamento em profundidade. As sementeiras foram realizadas em duplicatas e incubadas a 30 °C por 24 horas (MAZO, 1999).

### 2.2.3 – Análises microbiológicas

#### 2.2.3.1 – Amostragem

Foram retiradas assepticamente 25g de músculo e realizadas diluições sucessivas em solução de água peptonada 0,1%. Para a detecção de *Salmonella* sp., a amostragem foi de 25g, adicionada diretamente ao caldo de pré-enriquecimento. Durante o desenvolvimento da fermentação, a cada quatro dias foram realizadas análises correspondentes à enumeração total de bactérias aeróbias mesófilas viáveis e contagem total de bactérias lácticas (APHA, 1992).

#### 2.2.3.2 – Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos

A contagem foi realizada pelo método do plaqueamento em profundidade em *plate count agar* – PCA. Após a inoculação e solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas a 37 °C por 48 horas (APHA, 1992).

#### 2.2.3.3 – Contagem de bactérias lácticas

A enumeração foi feita pelo método de plaqueamento em profundidade em ágar MRS. Após a inoculação e solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas a 30 °C por 24 horas (APHA, 1992).

#### 2.2.3.4 – Avaliação de coliformes a 45 °C

Foi utilizada a técnica do número mais provável (NMP), indicada para a detecção de baixas concentrações de coliformes e por apresentar maior sensibilidade do que os métodos de plaqueamento (APHA, 1992).

#### 2.2.3.5 – Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

Como meio seletivo para a enumeração de *Staphylococcus*, foi utilizado o Baird-Parker Agar. O meio combina telurito de potássio (0,01%), glicina (1,2%) e cloreto de lítio (0,5%) como agentes seletivos e a redução do telurito e a hidrólise da gema de ovo como características diferenciais (APHA, 1992).

#### 2.2.3.6 – Detecção de *Salmonella* sp.

A técnica de análise consistiu do pré-enriquecimento de 25g da amostra em 225mL de lactose Broth. O meio inoculado foi incubado a 37 °C por 24 horas. A seguir, foi realizado o enriquecimento seletivo em *selenite cystine broth* – SC broth e em *tetrathionate enrichment broth* – TTB (caldo de enriquecimento tetratoato). Posteriormente foram feitas identificações bioquímicas conforme metodologia da APHA (1992).

### 2.2.4 – Análises físico-químicas

#### 2.2.4.1 – Composição química

A determinação da composição centesimal foi realizada segundo técnicas da Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1995): umidade e resíduo mineral fixo por gravimetria (técnicas 950.46 e 938.08); proteínas pelo método macro-Kjeldahl (nitrogênio total x 6,25) (técnica 940.25) e extrato etéreo (submersão) por extração com éter de petróleo (técnica 991.36).

#### 2.2.4.2 – Nitrogênio total (NT) e nitrogênio solúvel (NS)

As soluções de fermentação tiveram seus conteúdos de nitrogênio total e nitrogênio protéico solúvel avaliados a cada quatro dias pelo método macro-Kjeldahl (FAO, 1993).

#### 2.2.4.3 – pH

Foram removidas amostras com 10g das cubas de fermentação e homogeneizadas com água destilada (10mL) (AOAC, 1995). O pH foi medido potenciométricamente a cada 4 dias de fermentação.

#### 2.2.4.4 – Acidez titulável total (ATT)

Utilizando o mesmo homogeneizado preparado para a determinação do pH, a ATT foi determinada a cada quatro dias por titulação com NaOH 0,1N em presença de solução alcoólica de fenolftaleína 1%, com resultado expresso em ácido láctico (% p/p). O final da titulação foi verificado em pH 8,0 (técnica 162.76) (AOAC, 1995).

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 – Matéria-prima

##### 3.1.1 – Composição química

A Tabela 1 apresenta os valores da composição química (umidade, resíduo mineral fixo, lipídios, proteínas) e pH das amostras de bonito-de-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*). As concentrações estão expressas em percentuais sobre o músculo com pele do pescado congelado.

TABELA1 – Composição química e pH das amostras de bonito-de-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*) congelado a -18 °C.

X ± Dp: média ± desvio padrão.		
Componentes	X	Dp
Umidade (%)	69,33	±0,57
Resíduo mineral fixo (%)	1,07	±0,3
Lipídios (%)	2,13	±0,33
Proteínas (%)	32,40	±0,6
pH	6,0	±0,1

A comparação dos resultados obtidos com aqueles já publicados por outros autores ficou em parte prejudicada por não ter sido citado, em vários casos, o nome científico e sim o nome vulgar da espécie estudada. Com relação à percentagem de umidade, a variação se situou na faixa correspondente aos peixes marinhos, entre 66 e 84% (AQUARONE et al., 1983). Linden e Lorient (1994) mencionam teores entre 70 e 80% e 60 e 90%. Observam que a estação do ano afeta o conteúdo de umidade do pescado, relacionando a época de captura com a composição centesimal. Com o valor de 69,33% (Tabela 1), pode-se afirmar que a amostra analisada possui teor de lipídios reduzido e teor de proteínas elevado em relação a valores normalmente encontrados (AQUARONE et al., 1983), o que acarretou um valor inferior no teor de umidade. A divergência entre os teores de lipídios apresentados na literatura (AQUARONE et al., 1983), que mostra valores próximos de 5,70% para essa espécie crua e o encontrado experimentalmente de 2,13% (Tabela 1), deve-se à influência de fatores tais como a idade do animal e a temperatura da água (*habitat*).

Comparando os valores obtidos na Tabela 1 e considerando o valor nutricional, pode-se dizer que o resultado referente ao teor de lipídios permite classificar essa matéria-prima na categoria de alimento com baixo teor de gordura (< 5%).

A literatura (AQUARONE et al., 1983) apresenta valor de 26% para o teor de proteínas, inferior ao apresentado na Tabela 1, pois a amostra analisada possui elevado teor de umidade. Independentemente dos valores obtidos, é preciso considerar, ainda, que o sexo pode determinar variação na composição protéica devido ao estado fisiológico; as fêmeas são mais ricas em proteínas no início do seu ciclo sexual que os machos, enquanto o inverso pode ser observado após a desova.

Quanto aos teores de resíduos minerais, o bonito-de-barriga-listrada apresentou valor equivalente a 1,07% (Tabela 1), que se aproxima ao valor de 1,3% observado na literatura (AQUARONE et al., 1983). O pescado é rico em minerais, possui o fósforo complexado com lipídios e enxofre, ferro e cobre associado com proteínas.

Para os peixes, os fenômenos de aparecimento e resolução da rigidez cadavérica são rápidos, porém o enrijecimento *post mortem* e a queda de pH são graduais. O pH se reduz geralmente de 7 para 6 no peixe com baixo teor de gordura e até 5,6 no músculo escuro do pescado gorduroso. É desejável que a conservação pelo frio se processe o mais rápido possível em pH reduzido, possibilitando o aumento de vida-de-prateleira (FAO, 1995; LINDEN; LORIENT, 1994). De acordo com a Tabela 1, o valor médio encontrado para o pH foi 6,0. Os resultados indicam um pescado em condições adequadas de processamento e conservação.

##### 3.1.2 – Avaliação microbiológica

A Tabela 2 mostra os resultados da avaliação microbiológica do bonito-de-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*) relacionada com microorganismos indicadores de higiene ou processamento, de contaminação fecal e patogênica. De acordo com a ANVISA (Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001), os resultados indicam um pescado com a carga bacteriana de conformidade com os padrões requeridos para o processamento de alimentos quanto a contaminação fecal, sendo o valor máximo aceitável de  $10^3$  NMP g<sup>-1</sup>. O resultado encontrado foi inferior a  $10^3$  NMP g<sup>-1</sup>, evidenciando práticas adequadas de higiene conforme padrões associados às Boas Práticas de Fabricação – BPF. Utilizando como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanificação das superfícies operacionais a enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva*, mostra que não houve detecção do microorganismo. Todas as amostras apresentaram resultados negativos com relação à detecção de *Salmonella* sp.

TABELA 2 – Avaliação microbiológica das amostras do bonito-de-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*)

Microorganismos	Determinação		
	A	B	C
Microorganismos aeróbios mesófilos viáveis (UFC g <sup>-1</sup> )	1,0 x 10 <sup>3</sup>	8,0 x 10 <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>3</sup>
<i>Salmonella</i> sp. (em 25 g amostra)	Ausência	Ausência	Ausência
Coliformes a 45 °C (NMP g <sup>-1</sup> )	< 3	< 3	< 3
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC g <sup>-1</sup> )	Ausência	Ausência	Ausência

A, B, C = Repetições.

### 3.2 – *Lactobacillus sakei*

#### 3.2.1 – Caracterização morfológica

A colônia isolada mostrou uma coloração creme, com forma circular, superfície lisa, presença de brilho, com margem regular inteira, elevação convexa, consistência cremosa.

#### 3.2.2 – Caracterização fisiológica

A caracterização do cultivo é mostrada na Tabela 3. Foi obtida com incubação a 30 °C e leitura de crescimento em até 48 horas. Como teste complementar, a linhagem apresentou-se como aerotolerante e não mostrou motilidade em meio semi-sólido. É uma espécie homofermentativa, cresce a 8 e 15 °C, mas não se desenvolve a 45 °C.

TABELA 3 – Caracterização fisiológica do *Lactobacillus sakei*

pH	Halofilismo (% NaCl)			Crescimento (°C)			Liquefação da gelatina
	6,5	7,0	10	8	15	45	
3,9	6,5	7,0	10	8	15	45	
+	+	+	w	+	+	-	-

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo; (W) resultado positivo fraco.

As características da cepa estão de acordo com Sneath (1986), que afirma que o gênero *Lactobacillus* raramente apresenta motilidade e, quando esta acontece, sempre é realizada através de flagelos peritricos. Podem crescer em superfícies de meios semi-sólidos por anaerobiose ou sob pressão de oxigênio reduzido. São acidófilos, com crescimento em pH 5 ou menos e temperatura entre 2 e 53 °C. São incapazes de liquefazer a gelatina.

Alguns parâmetros relacionados com a caracterização fisiológica também estão de acordo com Gonzáles-Fernandez et al. (1997), que, estudando a influência de cultivos iniciadores relacionados com as propriedades sensoriais da lingüiça tipo frescal, complementaram suas pesquisas caracterizando duas cepas de *Lactobacillus sakei* e uma de *pediococcus* sp. As linhagens isoladas de *L. sakei* também apresentaram crescimento em pH 3,9 e em concentrações de 7 e 10% NaCl.

### 3.3 – Fermentação do pescado

#### 3.3.1 – Avaliação do pH e acidez

Os resultados das análises físico-químicas indicam que houve redução do pH à medida que a fermentação se desenvolveu, com tendência a estabilização entre 4,25 e 4,11, após 21 dias, como mostra a Figura 2, referente à reprodução dos tratamentos com aplicação do inóculo, associada a 2% NaCl e 2%, 4% e 6% glicose. O efeito da redução inicial do pH sugere como uma das causas a produção de ácido, a partir do cultivo iniciador inoculado, inibindo a multiplicação da carga microbiana de deterioração e permitindo a seqüência da fermentação. A produção de ácido é um mecanismo inespecífico, que afeta todas as bactérias ácido-sensíveis, indiscriminadamente. Gory et al. (2001) mencionam esse comportamento numa avaliação do crescimento de três cepas de *L. sakei* (duas geneticamente modificadas), associadas à produção de lactato e variação de pH. O valor inicial (pH), que era 5,6, reduziu-se para 4,2 a 30 °C em 24 horas.

Diferentemente dos outros tipos de animais, os peixes marinhos teleosteos possuem elevado pH, aminoácidos livres e óxido de trimetilamina – OTMA (composto osmorregulador). Este último, por redução microbiana produz trimetilamina – TMA. Entretanto, nenhum desses efeitos impediu a eficiência do cultivo iniciador (*L. sakei*) sobre o substrato em estudo.

Os valores do pH encontrados no final da fermentação do bonito-de-barriga-listrada (4,11 a 4,25) estão de acordo com Adams e Nicolaidis (1997). Esses pesquisadores demonstraram que o pH, sendo o limite crítico para a multiplicação de microorganismos deteriorantes, pode ser exemplificado por meio da sobrevivência da *Salmonella* em determinadas condições. Quando o pH decresce de 7 para 5, o efeito inibitório começa a ser detectado com maior significação, associado aos processos de conservação. Ainda, considerando outras

pesquisas, associadas a esses mesmos autores, microorganismos como o *Campylobacter jejuni*, comparado a *Salmonella*, apresenta menor resistência; não cresce em temperaturas inferiores a 30 °C e não sobrevive quando o pH é reduzido para 4,5. Entretanto, devemos verificar que o efeito antimicrobiano das condições ácidas não depende somente do pH, mas das características do ácido envolvido no processo inibitório, como o grau de dissociação e o efeito tóxico inerente da própria molécula ácida.

Os resultados apresentados na Figura 2 indicam que a fermentação láctica do substrato foi obtida da maneira como se esperava.

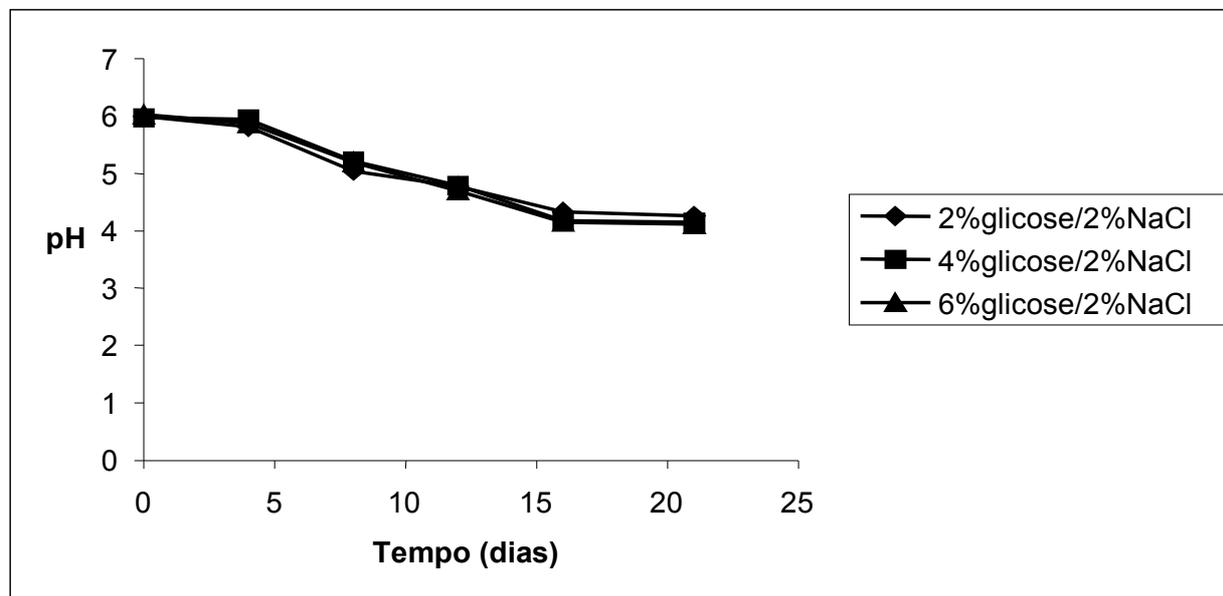


FIGURA 2 – Variação do pH durante a fermentação das amostras do bonito-de-barriga-listrada com a adição de 2, 4 e 6% de glicose e 2% NaCl

Analisando a Figura 2, observa-se que, com o emprego de 2% de glicose, o pH decresce para 5,8 após quatro dias e atinge 4,2 com 21 dias de fermentação, demonstrando certa equivalência intermediária. Com a utilização de 4% glicose, a redução de pH mostra-se mais sensível. No intervalo entre o 12º e o 16º dia de fermentação, o pH apresentou maior variação, reduzindo-se de 4,8 para 4,2. Com a presença de 6% de glicose, o resultado mostrou ainda uma maior variação de pH, considerando o início e o fim da fermentação, com 21 dias. O valor do pH inicial foi 6,0 e atingiu 4,1 com 21 dias.

Os valores de pH e acidez encontrados no experimento, utilizando 6% glicose e 2% NaCl, assemelham-se aos encontrados por Olympia et al. (1992), os quais relacionaram a atividade das bactérias lácticas e suas enzimas. O produto pesquisado, o *burong bangu*, consumido nas Filipinas e obtido por fermentação do amido de mandioca agregado ao pescado, apresentou pH e acidez após 10 dias de fermentação, equivalente a 4,2 e 1,2%, respectivamente. Nesse estágio, o alimento poderia ser considerado pronto para o consumo.

A Figura 3 apresenta a produção de ácido láctico durante a fermentação do bonito-de-barriga-listrada, reproduzindo os tratamentos com a aplicação do cultivo iniciador, associado a 2, 4, 6% de glicose e 2% NaCl (p/p). Com tratamento correspondente a adição de 2% de glicose e 2% de NaCl, a acidez obtida após 21 dias de fermentação obteve o máximo valor, equivalente a 2,84. Com 4% de glicose e mesmo teor salino, atingiu 3,78%. Assim que, quando se agrega 2% de glicose e 2% de NaCl, o pH reduziu-se para 5,0 em 8 dias e para 4,2 em 21 dias. Reciprocamente, a acidez aumenta para 1,28 e 2,83%, respectivamente. Com 6% de glicose e 2% de NaCl, o pH reduziu para 5,2 em 8 dias e 4,1 em 21 dias. Por sua vez, a acidez aumentou para 1,11% (8 dias), e 3,95% (21 dias).

Utilizando 2% glicose com 2% NaCl, a variação da acidez (2,8%) mostrou aumento significativo em relação ao tratamento com 4% glicose (3,78%) e 6% glicose (3,95%). Comparando os valores de acidez dos tratamentos 4 e 6% (glicose), ocorreu um baixo aumento na acidez. Essa baixa variação pode estar associada à dificuldade da cepa utilizada em metabolizar essa concentração da glicose, não convertendo todo o carboidrato disponível em ácido láctico.

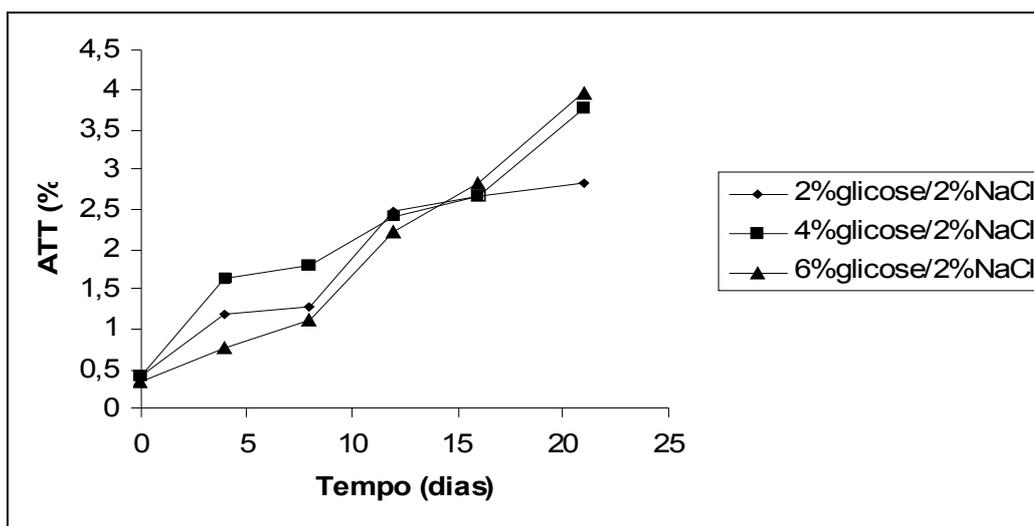


FIGURA 3 – Produção de ácido láctico durante a fermentação do bonito-de-barriga-listrada com 2, 4 e 6% de glicose e 2% de NaCl (p/p).

### 3.3.2 – Atividade antagonista do cultivo iniciador

Como pode ser observado (Figuras 4, 5 e 6), as bactérias lácticas apresentam bom desempenho na inibição dos microorganismos deterioradores. A rapidez e a eficiência da fermentação foi monitorada pela relação do decréscimo do pH e o balanço entre a enumeração das bactérias lácticas e o total de bactérias deterioradoras. A queda do pH foi devida à produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas, o que não descarta a possibilidade de produção desse ácido por outros microorganismos. Tanasupawat e Komagata (1995) mencionam que os estafilococos presentes em pescado fermentado, com características de coagulase positiva e hemolisina negativa, têm a capacidade de produzir pequena quantidade de ácido láctico, porém sem influência maior no desenvolvimento da fermentação e produção desses alimentos pesqueiros.

Considerando a carga inicial das bactérias deterioradoras em PCA ( $10^3$  UFC  $g^{-1}$ ), ocorreu significativo aumento da contagem nos primeiros oito dias de fermentação ( $10^8$  UFC  $g^{-1}$ ) e decresceu gradualmente a partir desse tempo até o 21º dia para todas as amostras ( $10^4$  a  $10^5$  UFC  $g^{-1}$ ). Observa-se que o nível de variação no PCA foi similar em todos os casos. O aumento no teor de glicose (2, 4 e 6%) não causou diferença significativa na contagem bacteriana, sendo que o teor 6% glicose apresentou o maior valor ( $1,1 \times 10^5$ ). Isso pode estar associado à incapacidade da cepa de *L. sakei* em metabolizar nessa concentração, ficando o excesso de glicose disponível no meio para proliferação microbiana.

O aumento inicial na carga bacteriana deteriorante nos primeiros oito dias de fermentação (Figura 4) se deve à presença de bactérias não-formadoras de ácidos que gradualmente desaparecem durante o processo pela transformação do meio em um substrato bastante acidificado. Comparando os resultados (Figura 4) com os obtidos com as bactérias lácticas (Figura 5), verificamos que esses microorganismos estão presentes apenas no reduzido estágio inicial da fermentação, enquanto que durante todo o período de processamento há uma predominância das bactérias formadoras de ácido láctico (a partir do oitavo dia). Estas inversões de crescimento, demonstradas pela diferença da população inicial de cada grupo de matéria-prima, presente no início da fermentação, podem ser explicadas como sendo um resultado da sensibilidade ao baixo pH e acidez elevada, presença de metabólitos antagonistas aos microorganismos deterioradores, necessidade de requerimentos nutricionais e mudança do potencial redox.

Os resultados apresentados na Figura 5 indicam que a rápida fermentação láctica do substrato (pescado) foi obtida como se esperava, mas não tão fácil, como se preconizava. A contagem em MRS a partir do 8º dia de fermentação e até o 21º, excedeu a dos deterioradores (PCA) entre  $1 \text{ Log}_{10}$  UFC  $g^{-1}$  e  $2 \text{ Log}_{10}$  UFC  $g^{-1}$ . Assim que, a relação de fermentação foi maior em todos os tratamentos, proporcionando uma diferença de contagem em MRS, em pelo menos  $1 \text{ Log}_{10}$  UFC  $g^{-1}$ .

Os comportamentos das curvas (Figura 4 e 5) estão de acordo com Adams et al. (1987), cujos estudos com *L. plantarum* e *P. pentosaceus* mostraram que a relação de fermentação aumenta na faixa entre 1 e 5% de glicose ou sacarose, ao passo que, aumentando a concentração de NaCl (1 para 6%), há uma relação de redução de fermentação. Ou seja, a utilização da concentração de 6% glicose não é metabolizada pelo *L. sakei* em sua totalidade, o que acarretou um baixo crescimento das bactérias lácticas em relação à concentração de 4% de glicose. A utilização de 2% de glicose, em contrapartida, foi insuficiente para propiciar um maior crescimento da carga láctica.

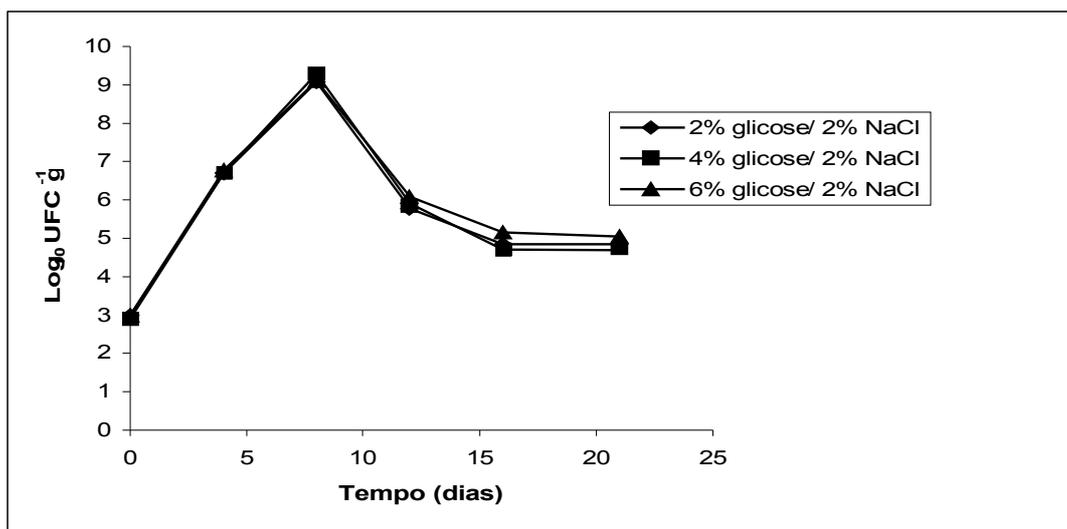


FIGURA 4 – Variação na contagem total de microorganismos deterioradores em placas sobre PCA ( $\text{Log}_{10} \text{UFC g}^{-1}$ ) durante a fermentação do bonito-de-barriga-listrada pelo *L. sakei*, com 2% NaCl. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% glicose.

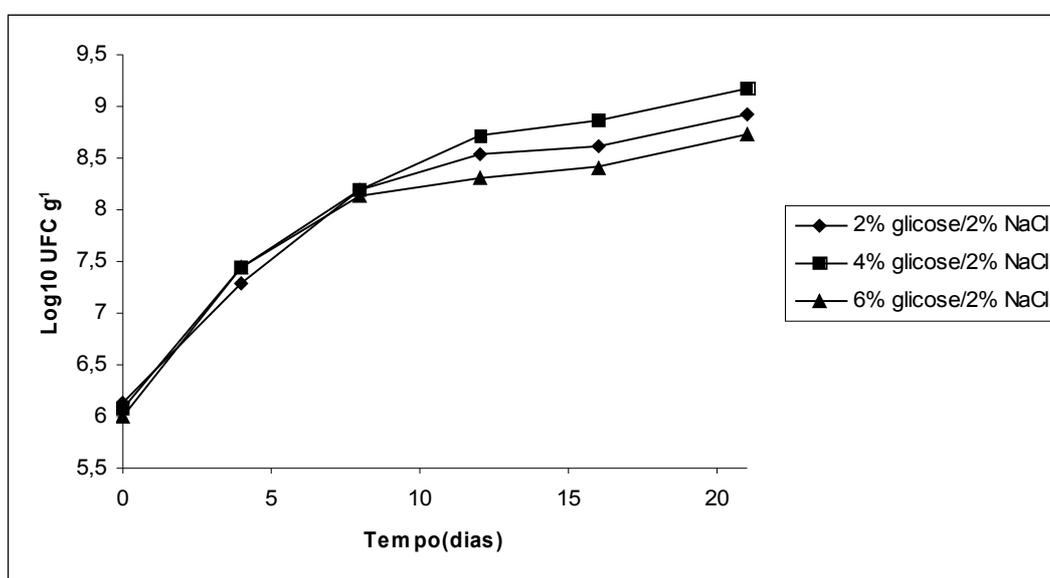


FIGURA 5 – Variação na contagem das bactérias lácticas sobre MRS ( $\text{Log}_{10} \text{UFC g}^{-1}$ ) durante a fermentação do bonito-de-barriga-listrada pelo *L. sakei*, com 2% NaCl. O efeito foi comparado através da adição de 2, 4 e 6% glicose.

A potencialidade das bactérias lácticas associadas com os processos fermentativos depende do tipo de carboidrato utilizado. Adams et al. (1987) avaliaram o uso do amido de arroz e mandioca como carboidratos alternativos, durante 24 horas de pré-fermentação, em produtos elaborados com peixe. Contrariamente ao amido de arroz, a utilização da mandioca (20% p/p) resultou em rápida fermentação; o pH reduziu-se para valores inferiores a 4,5 e a relação entre as bactérias lácticas e as deterioradoras excedeu  $4 \text{ Log}_{10} \text{UFC g}^{-1}$  nas primeiras 48 horas de crescimento. Assim como neste trabalho, foi necessário o uso de um carboidrato com baixo peso molecular (2% glicose) para prevenir o aumento do pH nos primeiros dois dias de fermentação.

O NaCl tem um efeito negativo ao criar condições desfavoráveis para as bactérias lácticas, interferindo na redução do pH; justifica-se assim o emprego de uma única concentração de NaCl na fermentação do bonito-de-barriga-listrada. No estudo desenvolvido por Morzel et al. (1997), o efeito negativo começou a ser observado na mais baixa concentração de NaCl ( $10 \text{ g.Kg}^{-1}$ ), e, se fosse considerada somente a otimização do pH relacionado com o crescimento bacteriano, os parâmetros mais adequados seriam equivalentes a  $5 \text{ g.Kg}^{-1}$  glicose e temperatura de incubação fixada em  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  quando a carga das bactérias lácticas foi maior.

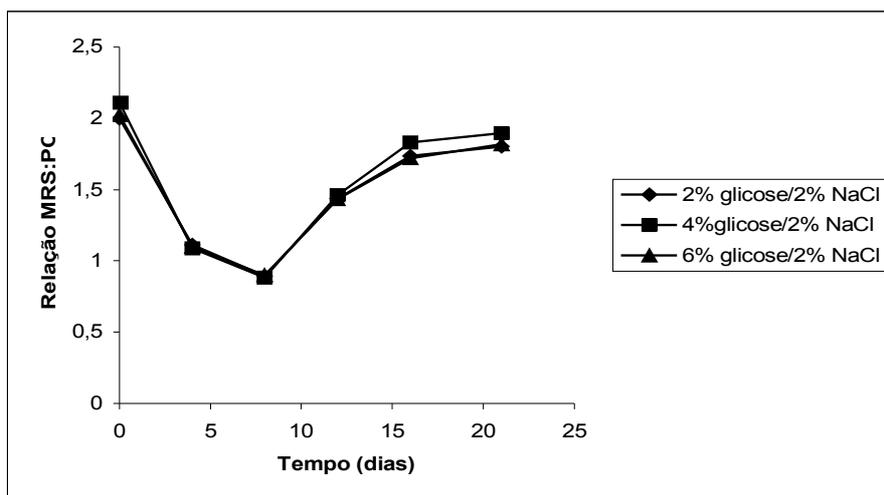


FIGURA 6 – Efeito da adição da glicose (2, 4 e 6%) e NaCl (2%) na relação (MRS/PCA) envolvida na fermentação do bonito-de-barriga-listrada (*E. pelamis*)

### 3.3.3 – Relação entre o nitrogênio total (NT) e o nitrogênio solúvel (NS)

O conteúdo de nitrogênio total dos sobrenadantes de todas as amostras aumentou com o tempo de fermentação. O aumento do conteúdo de nitrogênio total pode ser atribuído ao efeito combinado da autólise e a degradação microbiana do pescado. O conteúdo de nitrogênio total e solúvel das amostras contendo 2 e 4% de glicose mostrou valores inferiores àsquelas com 6% glicose. Analisando a Figura 7, observou-se que a relação (NT/NS) se mostrou independente dos teores equivalentes a 2 e 4% de glicose, o que está de acordo com Santo (2003), em que também ficou constatada a mesma independência na fermentação de filés de sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*). Entretanto, durante todo o processo de fermentação, a concentração de 6% glicose não possibilitou a redução na concentração de nitrogênio solúvel, que provavelmente ocorreu devido ao fato de a cepa de *L. sakei* não metabolizar o excesso de glicose e, com isso, disponibilizar o carboidrato para possível utilização pelos microorganismos deterioradores.

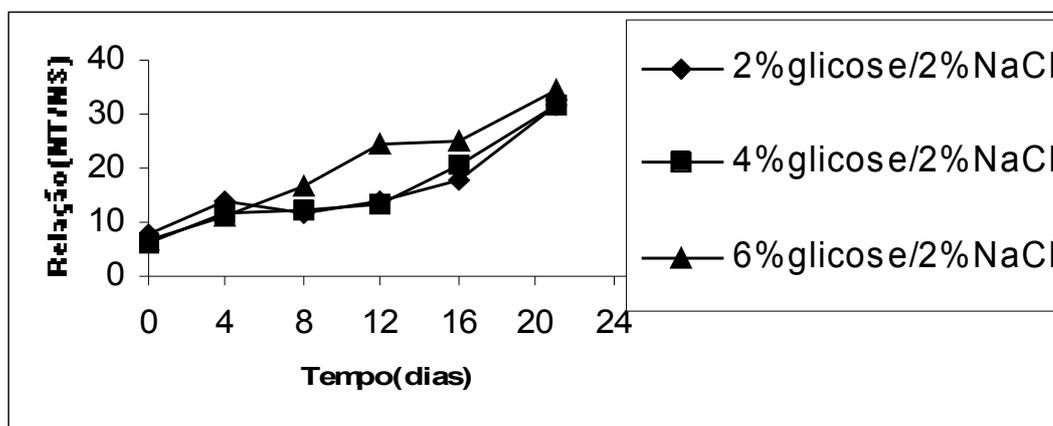


FIGURA 7 – Evidência de autólise durante a fermentação do bonito-de-barriga-listrada (*E. pelamis*)

Os resultados relacionados com o nitrogênio solúvel obtidos com a fermentação do bonito-de-barriga-listrada mostram um controle natural da fermentação desenvolvida pelo cultivo iniciador (*L. sakei*), exceto para concentração de 6% de glicose. A atividade do cultivo iniciador sugere uma reação amino-negativa, prevenindo a formação de aminas durante o processo de fermentação. A cepa parece não apresentar reação de descarboxilação de aminoácidos para a produção de aminas. Possivelmente também reduza a atividade de bactérias descarboxilases (microbiota acompanhante ou contaminante associada ao pescado) na formação de aminas biogênicas, contribuindo na redução do nitrogênio solúvel. Os riscos microbiológicos na fermentação do bonito-de-barriga-listrada (*E. pelamis*) estão sempre associados à formação de histamina; amina produzida através da descarboxilação da histidina pela histidina-decarboxilase. Silva et al. (1998), estudando os efeitos da temperatura de estocagem na formação de histamina em atuns (*Thunnus obesus* e *Katsuwonus pelamis*), constataram a formação dessa escombrotóxina em níveis considerados elevados (> 30 mg/100g) quando estas

espécies foram estocadas durante um, três e seis dias, entre 4 e 22 °C. Em face disso, pode-se dizer que a fermentação do bonito-barriga-listrada com a adição do cultivo iniciador (*L. sakei*) previne a formação de aminas biogênicas, o que é comprovado pela diminuição do nitrogênio solúvel analisado das dornas de fermentação (exceto para concentração 6% glicose) e é devido ao antagonismo das bactérias lácticas (*L. sakei*) adicionadas, frente às deterioradoras presentes no pescado. Portanto, sua aplicação torna-se viável na fermentação de atum, que é um pescado susceptível à formação de aminas biogênicas.

#### 4 – CONCLUSÃO

Em termos de comportamento e identificação, e de acordo com a caracterização morfológica e fisiológica, a cepa isolada de *L. sakei* mostrou resultados compatíveis com o grupo das bactérias lácticas acidúricas, produtoras de ácido láctico, Gram-positivas, catalase negativa e microaerófilas.

A pesquisa conclui que é possível obter-se a fermentação do bonito-de-barriga-listrada com o auxílio do cultivo iniciador *L. sakei*. Durante a fermentação e com auxílio da glicose (carboidrato fermentescível), a cepa demonstrou significativa eficiência na redução do pH e aumento da acidez com a produção de ácido láctico.

O estudo indica um grande efeito antagonico do *L. sakei* sobre a microbiota deterioradora no processo de fermentação. Com 21 dias de incubação, quando a contagem das bactérias lácticas atingiu  $10^8$  a  $10^9$  UFC g<sup>-1</sup>, a enumeração das bactérias deterioradoras apresentou uma redução de quatro ciclos logaritmos após significativo aumento desta microbiota nos primeiros oito dias de fermentação. Este resultado mostra o efeito antagonico desenvolvido pela cepa.

O processo de fermentação mostra o aumento do nitrogênio total do sobrenadante à medida que aumenta o tempo de fermentação. O aumento do conteúdo do nitrogênio total é atribuído ao efeito metabólico representado pela combinação da autólise e proteólise envolvidas. A evidência para a autólise neste experimento pode ser mostrada pela mudança na relação entre o nitrogênio total e o nitrogênio solúvel.

Com base nos dados obtidos nos experimentos, podemos afirmar que o melhor tratamento para fermentação do bonito-de-barriga-listrada (*Euthynnus pelamis*) utilizando a cepa isolada de *L. sakei* é 4% glicose e 2% NaCl (condições do tratamento), em que se obteve a melhor relação para MRS/PCA e NT/NS.

#### REFERÊNCIAS

- 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.
- ADAMS, M. R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, Oxford, v. 8, n. 5-6, p. 227-239, 1997.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3. ed. Washington, 1992. 1219p.
- AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgar Blücher, 1983. 227p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis. 16 ed. Washington, 1995. p. 1141.
- BROMBERG, R. A batalha contra os microorganismos patogênicos. *Revista Nacional da Carne*, São Paulo, n. 336, p. 86-87, fev. 2005.
- DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, Chicago, v. 43, p. 164-167, 1989.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. Manual de técnicas para laboratório de nutrición de peces e crustaceos. Programa cooperativo gubernamental, México, 1993. p.104.
- \_\_\_\_\_. Quality and quality change in fresh fish. Roma, 1995, p. 195.
- GONZÁLES-FERNANDEZ, C.; SANTOS, E. M.; JAIME, I.; ROVIRA, I. 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.
- GORY, L.; MONTEL, M.C.; ZAGOREC, M. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. *Microbiology Letters*, Amsterdam, Federation of European Microbiological Societies, v. 194, n. 2, p. 127-133, 2001.
- JEPPESEN, V. F.; HUSS, H. H. Biological preservation of seafood by lactic acid bacteria. *Infotech Int.*, v. 5, p. 29-34, 1993.
- KANASAKI, M.; BREHENY, S.; HILLIER, A. J. Effects of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. *Australian Journal Food Protection*, p. 142-144, 1975.
- LINDEN, G.; LORIENT, D. Bioquímica agroindustrial: revalorización alimentaria de la producción agrícola. Zaragoza: Acribia, 1994. 428p.
- 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, 1997.
- MAZO, J. Z. Detecção de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus plantarum* BN em melaço de cana-de-açúcar sob fermentação submersa. Florianópolis, 1999. Dissertação [Mestrado em Ciência dos Alimentos] – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. p. 46.
- OLYMPIA, M.; ONO, H.; SHINMYO, A.; TAKANO, M. Lactic acid bacteria in a fermented fishery product “burong bangus”. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 73, n. 3, p. 193-197, 1992.

- OSTERGAARD, A.; EMBAREK, P. K. B.; WEDELL-NEERGAARD, C.; HUSS, H. H.; GRAM, L. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *Food Microbiology*, v. 15, n. 2, p. 223-233, 1998.
- SANTO, M. L. P. E. Efeito da bacteriocinogenicidade do *Lactobacillus sakei* 2a na qualidade microbiológica da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) fermentada. Florianópolis, 2003 [Doutorado em Ciências dos Alimentos] – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 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.
- SNEATH, P. H. A. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, v. 2, seção 14, p. 1208-1230, 1986.
- TANASUPAWAT, S.; KOMAGATA, K. Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Cingapura, v. 11, p. 253-256, 1995.